

**VIVIANE MILCZEWSKI**

**INFLUÊNCIA SAZONAL NA FUNÇÃO TESTICULAR DE OVINOS DA RAÇA  
SUFFOLK EM BAIXA LATITUDE: INTER-RELAÇÕES ENTRE CIRCUNFERÊNCIA  
ESCROTAL, PARÂMETROS MORFOLÓGICOS TESTICULARES E  
TESTOSTERONA SÉRICA COM A PRODUÇÃO DE SÊMEN**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Processos Biotecnológicos.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Samira Chahad-Ehlers**

**CURITIBA  
2008**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

VIVIANE MILCZEWSKI

**INFLUÊNCIA SAZONAL NA FUNÇÃO TESTICULAR DE OVINOS  
DA RAÇA SUFFOLK EM BAIXA LATITUDE: INTER-RELAÇÕES ENTRE  
CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, PARÂMETROS MORFOLÓGICOS  
TESTICULARES E TESTOSTERONA SÉRICA COM A PRODUÇÃO DE SÊMEN**

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanete Thomaz-Soccol  
Departamento de Patologia Básica, UFPR

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Samira Chahad-Ehlers  
Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, UFPR

Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki  
Curso de Medicina Veterinária, PUC-PR

Prof. Dr. Luiz Guilherme Soares da Rocha Bauzer  
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Nogueira de Moraes  
Departamento de Fisiologia, UFPR

Curitiba, 29 de fevereiro de 2008.

**Às minhas filhas Júlia e Mariana**

Pelas horas que adormeceram em somente um dos meus braços enquanto o outro se ocupava com a caneta...

Pelas horas de ausência...

Por permitirem sem entender...

Para que um dia entendam e possam se orgulhar...

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Vanete Thomaz-Soccol pelo exemplo de dedicação, por aceitar o desafio deste trabalho e por mostrar o melhor caminho a ser seguido.

À professora Rosana Nogueira de Moraes pela orientação nas determinações hormonais e pelo apoio laboratorial.

À colega Katherine Maria Spencoski pelos inestimáveis préstimos nos trabalhos laboratoriais das determinações de testosterona.

Ao professor José Ederaldo Queiroz Telles que acolheu parte deste trabalho na rotina de exames histológicos de seu laboratório do Hospital de Clínicas.

À colega Juliana Leone Staut pela dedicação no longo trabalho histológico e pelo manejo do programa Image Pró Plus®

À professora Alda Lúcia Gomes Monteiro e ao professor Luimar Perly pela cessão das instalações da Fazenda Experimental do Canguiri da UFPR permitindo a permanência dos animais e também pela alimentação durante o período experimental.

Ao professor Adonai Schlup Sant'anna pela gentileza e auxílio na equação matemática de volume testicular.

À CAPES pela bolsa cedida no decorrer do doutoramento.

Aos funcionários do Laboratório de Produção de Ovinos e Caprinos, Sérgio Salamei e Vítor Gonçalves pelos cuidados de alimentação e manejo diários dos carneiros.

Às colegas do Laboratório de Parasitologia Molecular da UFPR, Juliana Tracz Pereira e Luciane Henning pelo convívio agradável e por todos os auxílios no laboratório.

Às professoras Edilene Alcântara de Castro e Rosangela Clara Paulino pelas valiosas ajudas no funcionamento dos equipamentos do laboratório.

Aos acadêmicos Fernando Dalla Costa e Jorge Luiz Rizzi Galerani pela dedicação na padronização do uso do espectrofotômetro.

A todos os estagiários do Laboratório de Parasitologia Molecular que auxiliaram nos trabalhos de campo.

Um agradecimento especial aos meus amigos André Luiz de Almeida Melo e Nelson L.M. Fernandes que dedicaram seu tempo nos auxílios dos exames andrológicos dos carneiros. A alegria e descontração de vocês transformaram o trabalho de campo em uma rotina muito mais agradável. Muito obrigada pela "força"!

Às amigas Maria da Graça Schwartz e Jannifer Silva Caldas pela amizade, pela troca de conhecimentos e pelo empréstimo dos equipamentos para exames andrológicos.

À minha amiga Fernanda Rosalinski de Moraes pelo incentivo e por todos os planos do início desta nossa jornada.

À minha amiga Cristina Santos Sotomaior pelo importante impulso inicial, por compartilhar comigo a paixão no trabalho com pequenos ruminantes e pela longa e inabalável amizade que construímos.

À Verena, Porcício e Ricardo Vilani pelos cuidados e amparo às minhas filhas enquanto estive ausente para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãos e cunhados pelas incansáveis palavras de apoio e por zelarem constantemente da minha família. Este trabalho não poderia ser realizado sem o auxílio de cada um de vocês.

Um agradecimento carinhoso aos meus sobrinhos Luiz Eduardo Zilli pelas fotos, Andréa Cristina Zilli pela companhia e Fernando Milczewski pela ajuda na formatação, até na madrugada...

**Agradecimento especial**

à grande amiga

**Samira Chahad-Ehlers**

por me apresentar à ciência chamada Cronobiologia,  
mostrando-me a importância e despertando em mim o encanto  
pela ciência básica. Agradeço a sua dedicação e grande paciência  
durante meu aprendizado. A amizade criada entre nós no decorrer  
deste período foi um dos bons frutos que este trabalho rendeu.

## RESUMO

Para avaliar as modificações reprodutivas sazonais em ovinos e estimar a viabilidade da utilização de sêmen ovino em biotecnologias aplicadas à reprodução, foram pesquisados quinze carneiros da raça Suffolk sendo doze de um ano de idade e três reprodutores de três anos. Os animais permaneceram sob influência da variação natural do fotoperíodo em Pinhais, Paraná, Brasil (latitude 25°25'40"S) em condições de confinamento e foram submetidos mensalmente ao registro da massa, condição corporal e colheita de sangue para a quantificação das concentrações de testosterona sérica. Foram realizados exames andrológicos quinzenais, destacando a medida da circunferência escrotal, volume e concentração seminal, motilidade progressiva, vigor, turbilhonamento e morfologia espermática. Medidas dos eixos testiculares foram utilizadas para inferir o volume testicular, através de equação matemática. No mês coincidente com a maior circunferência escrotal (março), testículos de seis carneiros foram colhidos para análise histológica, o mesmo ocorrendo no mês (julho) em que ocorreu a menor circunferência escrotal. Foram observadas modificações sazonais significativas da circunferência escrotal, concentrações de testosterona, volume e concentração espermática entre estes dois momentos. Estas características apresentaram valores máximos no verão e valores mínimos no inverno. Não houve diferença no padrão sazonal entre animais de um ou de três anos. Foi verificado aumento significativo do diâmetro dos túbulos seminíferos e de células da linhagem germinativa, em testículos colhidos no final de verão (março) contrapondo ao inverno (julho). O número de células de Sertoli se manteve constante nos momentos de maior e de menor circunferência escrotal. Não houve correlação significativa entre variação mensal da massa corporal e circunferência escrotal, porém, esta esteve correlacionada às modificações do fotoperíodo. Com a utilização de equação matemática, foi possível validar a metodologia que estima o volume testicular utilizando medidas dos eixos das gônadas. A análise conjunta dos resultados permitiu inferir que carneiros da raça Suffolk, na latitude estudada, apresentaram melhores condições reprodutivas no final do verão e condições inferiores no inverno sem, no entanto, haver pausa reprodutiva em qualquer época do ano. Descarte ou seleção de animais para reprodução não deveriam ser realizados no período de inverno, uma vez que a circunferência escrotal sofre grande influência sazonal. Da mesma forma a congelamento de sêmen deveria ser evitada devido à redução significativa de espermatozoides no ejaculado nesta estação.

Palavras-chave: Sazonalidade Reprodutiva. Ovino Suffolk. Função reprodutiva. Espermiograma. Hemisfério Sul.

## ABSTRACT

To evaluate seasonal reproductive changes in ovine and estimate the viability using ovine semen in reproductive biotechnologies, fifteen Suffolk rams, either with one (n=12) or three years of age were studied. The animals remained under natural influence of photoperiod in South of Brasil, Pinhais, Paraná (latitude 25°25'40"S) and intensive rearing conditions, in which they were monthly submitted to measuring of mass, body condition, and blood was withdrawn to quantify testosterone concentration. The rams were subjected fortnightly to andrological exams depicting measures of scrotal circumference, seminal volume and concentration, progressive spermatozoa motility, vigor, wave motion sperm and spermatid morphology. Testicular axis measures were used to infer the testicular volume by a mathematical equation. In the coincident months to larger and smaller scrotal circumference size, testicles from six rams were removed, in each moment, for histological analysis. Significant effect of season on the scrotal circumference, testosterone concentrations, volume and seminal concentration were observed. These characteristics presented maximum values in summer and minimum in winter. Difference on seasonal pattern among animals of one and three years old did not occur. A significant increase in the seminiferous tubules diameter and number of germinative lineage cells were verified in testicles removed in the end of summer (March) in opposition to winter (July). The number of Sertoli cells was constant either in the moment of larger or smaller scrotal circumference. There was no significant correlation between monthly variation of body mass and scrotal circumference, however, the last one was correlated to changes in photoperiod. By a mathematical equation, it was possible to validate the method in which the testicular volume is estimated by measuring gonadal axis. The analysis of results as a whole allowed to infer that Suffolk rams, in the latitude of the study, presented better reproductive conditions in the end of summer and lower conditions in winter without showing, however, a reproductive pause no time of the year. Discarding or selection of animals for reproduction should not be performed during winter since the scrotal circumference is under strong seasonal influence. For the same reason, freezing semen should be avoided due to the significant reduction of spermatozoa in the ejaculate verified in this season.

Key words: Seasonal Reproduction. Suffolk ram. Reproductive function. Spermiogram. South Hemisphere.



## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA TERRA MOSTRANDO COMO OS RAIOS SOLARES INCIDEM DE FORMA DIFERENTE CONFORME A SUA INCLINAÇÃO.....  | 22 |
| FIGURA 2 - MENSURAÇÃO DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL EM OVINOS DA RAÇA SUFFOLK COM O USO DE FITA MÉTRICA FLEXÍVEL PINHAIS (PR).....  | 44 |
| FIGURA 3 - MENSURAÇÃO DE LARGURA (a) E COMPRIMENTO (b) TESTICULAR EM OVINOS DA RAÇA SUFFOLK UTILIZANDO PAQUÍMETRO. PINHAIS (PR).....   | 45 |
| FIGURA 4 – MENSURAÇÃO DO VOLUME TESTICULAR ATRAVÉS DO DESLOCAMENTO DE ÁGUA EM BECKER.....  | 46 |
| FIGURA 5 – RELAÇÃO ENTRE A LUMINOSIDADE DIÁRIA E A CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE) DE CARNEIROS (Cs) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. HOVE CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE CE E FOTOFASE ( $p < 0,01$ PARA cS E $p < 0,05$ PARA rS). PINHAIS PR) .....                     | 54 |
| FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO EM “BOX PLOTTING” DESCREVENDO OS VALORES DA MASSA CORPORAL DE CARNEIROS SUFFOLK A PARTIR DE UM ANO DE IDADE (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E DE TRÊS ANOS (rS) (n=3), DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40"S. HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MÉDIAS DOS DOIS GRUPOS ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR) .....        | 56 |
| FIGURA 7 – MODIFICAÇÕES NA MASSA CORPORAL E DESENVOLVIMENTO TESTICULAR (CE) DE CARNEIROS SUFFOLK A PARTIR DE UM ANO DE IDADE (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40"S (n.s. NÃO HÁ CORRELAÇÃO; $p > 0,05$ ). PINHAIS (PR) .....   | 56 |
| FIGURA 8 – MODIFICAÇÕES NA MASSA CORPORAL E DESENVOLVIMENTO TESTICULAR (CE) DE REPRODUTORES SUFFOLK COM TRÊS ANOS DE IDADE (rS) (n=3) DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40" S. (n.s. DENOTA QUE NÃO HÁ CORRELAÇÃO; $p > 0,05$ ). PINHAIS (PR) .....   | 57 |
| FIGURA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS DE VOLUME CALCULADO (VC) E O VOLUME OBTIDO PELO DESLOCAMENTO DE ÁGUA (VDA) (ml) DO TESTÍCULO DIREITO DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12). NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS VC E VDA ( $p > 0,05$ ). PINHAIS (PR).....  | 58 |
| FIGURA 10 – VARIAÇÕES NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA (nM/l) E CIRCUNCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE) EM REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (a) (n=3) E CARNEIROS SUFFOLK (Cs) (b) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. HOVE CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA NO GRUPO CS ( $p < 0,001$ ) E NO GRUPO RS ( $p < 0,01$ ). PINHAIS (PR)..... | 60 |
| FIGURA 11 – VARIAÇÕES NO VOLUME DO EJACULADO E CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. FOTOFASE REPRESENTADA EM AMARELO. HOVE CORRELAÇÃO ENTRE VOLUME E CE ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR).....  | 62 |

- FIGURA 12 - DIFERENÇAS HISTOLÓGICAS ATRIBUÍDAS AO FOTOPERÍODO EM MOMENTO DE MAIOR (FINAL DE VERÃO) (a) E MENOR (INVERNO) CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL(b) EM TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CARNEIROS SUFFOLK EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR)..... 65
- FIGURA 13 – NÚMERO TOTAL MÉDIO POR TÚBULO SEMINÍFERO DAS DIVERSAS CÉLULAS DA LINHAGEM GERMINATIVA E CÉLULAS SERTOLI EM TESTÍCULOS DE OVINOS SUFFOLK SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S OBTIDOS NA ÉPOCA DE MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (FINAL DO VERÃO, n=6) E DE MENOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (INVERNO, n=6). LETRAS DIFERENTES ENTRE COLUNAS QUE COMPARAM CADA CARACTERÍSTICA INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR)..... 66
- FIGURA 14 - MÉDIA DAS VARIAÇÕES MENSAIS DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) COMPARADOS A UM CARNEIRO DO GRUPO (806), TODOS SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS MESES ( $p = 0,0133$ ). PINHAIS (PR)..... 67

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL DE CARNEIROS (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL CONFORME A ESTAÇÃO DO ANO EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....  | 55 |
| TABELA 2 - MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DO VOLUME TESTICULAR CALCULADO (Vc) ATRAVÉS DE FORMULA MATEMÁTICA E MENSURADO ATRAVÉS DE DESLOCAMENTO DE ÁGUA (Vm) DE REPRODUTORES SUFFOLK (n=12) NO INVERNO DE 2005 E NO VERÃO DE 2006, SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE FOTOPERÍODO. PINHAIS - PR.....  | 58 |
| TABELA 3 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TESTOSTERONA (nM/l) DE CARNEIROS SUFFOLK (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....  | 59 |
| TABELA 4 - MÉDIAS E DESVIO PADRÃO MENSAIS DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE), MOTILIDADE PROGRESSIVA (MP), VIGOR (V) E TURBILHONAMENTO (T) DO SÊMEN DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....                                  | 61 |
| TABELA 5 - VALORES MÉDIOS MENSAIS DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, VOLUME DO EJACULADO, CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....                             | 62 |
| TABELA 6 - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (rho) SEGUNDO MÉTODO DE SPEARMAN ENTRE VOLUME DO EJACULADO, MOTILIDADE PROGRESSIVA, VIGOR, TURBILHONAMENTO DO EJACULADO CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) AVALIADOS MENSALMENTE E SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR)..... | 63 |
| TABELA 7 - PORCENTAGEM MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....   | 63 |
| TABELA 8 - MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO DIÂMETRO, ESPESSURA E NÚMERO DE CAMADAS CELULARES DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CARNEIROS SUFFOLK NO MOMENTO DE MAIOR (n= 6) E MENOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (n= 6) CONFORME VARIAÇÃO REPRODUTIVA SAZONAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).....  | 64 |
| TABELA 9 - ESTIMATIVA DA VARIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE DOSES DE SÊMEN OVINO CONGELADO OBTIDO EM CADA MÊS DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S COMPARADOS AOS VALORES OBTIDOS POR UM CARNEIRO DO GRUPO. PINHAIS (PR).....                    | 68 |

## SUMARIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>14</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1 ASPECTOS CRONOBIOLOGICOS.....  | 19        |
| 2.2 RITMOS SAZONAIS E A REPRODUÇÃO EM OVINOS .....   | 21        |
| 2.3 TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA E SAZONAL.....   | 25        |
| 2.4 NEUROENDOCRINOLOGIA DA REGULAÇÃO SAZONAL REPRODUTIVA EM CARNEIROS .....  | 28        |
| 2.5 MODIFICAÇÕES SAZONAIS NA ESPERMATOGÊNESE E HISTOLOGIA TESTICULAR E AS RELAÇÕES COM O TAMANHO TESTICULAR .....    | 31        |
| 2.6 ALTERAÇÕES SAZONAIS NA QUALIDADE DO SÊMEN .....  | 35        |
| 2.7 EFEITOS MODULADORES DA SAZONALIDADE REPRODUTIVA .....  | 36        |
| 2.8 PADRÃO ANDROLÓGICO E VARIAÇÕES SAZONAIS DA QUALIDADE DO SÊMEN VISANDO AS BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO..... | 38        |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....   | 41        |
| 3.2 ANIMAIS .....  | 41        |
| 3.3 PARÂMETROS AVALIADOS .....   | 43        |
| 3.3.1 Mensuração da circunferência escrotal (CE) .....   | 44        |
| 3.3.2 Avaliação do volume testicular e espessura do escroto .....  | 44        |
| 3.3.3 Determinação da concentração sérica de testosterona.....   | 46        |
| 3.3.4 Avaliação das características seminais .....   | 48        |
| 3.3.5 Análise histológica e morfométrica testicular.....   | 50        |
| 3.4 PADRÃO ANDROLÓGICO E VARIAÇÕES SAZONAIS DA QUALIDADE DO SÊMEN VISANDO AS BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO..... | 51        |
| 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....  | 52        |
| <b>4 RESULTADOS .....</b>  | <b>53</b> |
| 4.1 CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE) E SUA RELAÇÃO COM FOTOPERÍODO.....  | 53        |
| 4.2 VOLUME TESTICULAR (VT) .....   | 57        |
| 4.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TESTOSTERONA .....  | 59        |
| 4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO SÊMEN .....   | 60        |

|   |            |
|---|------------|
| 4.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA .....  | 63         |
| 4.6 HISTOLOGIA TESTICULAR.....  | 64         |
| 4.7 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS VARIAÇÕES REPRODUTIVAS<br>SAZONAIS ..... | 66         |
| <b>5 DISCUSSÃO .....</b>  | <b>69</b>  |
| <b>6 CONCLUSÕES .....</b>   | <b>91</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                     | <b>92</b>  |
| <b>ANEXOS .....</b>   | <b>102</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das estratégias de sobrevivência e continuidade de espécie para a maioria dos animais silvestres é a restrição da atividade reprodutiva a uma determinada época do ano, de modo que os nascimentos ocorram num momento favorável para a sobrevivência dos recém-nascidos (LINCOLN e SHORT, 1980). Todavia, a seleção genética dirigida resultou na expansão da fase reprodutiva em animais destinados à produção. Mesmo assim, os ovinos têm uma marcada influência da sazonalidade na atividade reprodutiva. O ciclo anual do fotoperíodo diário tem sido identificado como o principal fator desencadeante deste fenômeno, enquanto a temperatura ambiental, estado nutricional, interação social, data de parto e fase de lactação têm sido considerados moduladores da sazonalidade reprodutiva.

A adaptação às características cíclicas que a maior parte dos ambientes terrestres apresenta é um fator importante para a sobrevivência dos seres vivos. Sendo assim, mecanismos temporais que geram ritmos endógenos diários (circadianos) e sazonais exercem importantes efeitos reguladores sobre a fisiologia e o comportamento animal (GERLACH e AURICH, 2000). Entender como um organismo responde às oscilações ambientais diárias e sazonais pode levar a compreensão dos mecanismos de uma série de coordenações do metabolismo e do comportamento, que por sua vez, poderão auxiliar na melhoria do manejo reprodutivo, na seleção de raças ou linhagens e ainda na otimização de biotécnicas utilizadas para conservação de material genético, como é o caso da congelamento de sêmen.

Os ovinos Suffolk são originários da Inglaterra e estão disseminados no mundo todo visando a produção de carne. No Brasil, esta raça está distribuída sobretudo no sudeste e sul e, especialmente, nos Estados voltados para a produção de cordeiros precoces como é o caso do Estado do Paraná. Mesmo em baixas latitudes, a raça Suffolk parece concentrar sua atividade reprodutiva em uma determinada época do ano, indicando que a sazonalidade é o principal fator sincronizador da fertilidade, mesmo em latitudes diferentes daquela em que a raça se originou (ABELLA, 1993).

Todas as raças ovinas de regiões temperadas são sensíveis às mudanças fotoperiódicas. Porém, os resultados de sincronização reprodutiva não são claros quando estes animais são submetidos a regimes tropicais e subtropicais que

apresentam baixa variação luminosa ao longo do ano. Raças originadas em clima temperado não mudam profundamente a duração da estação reprodutiva quando transportadas a climas tropicais e também é possível observar uma grande porção da população que apresenta uma estação de anestro nestas condições. Os ovinos originados em altas latitudes são normalmente submetidos a grandes variações luminosas ao longo do ano e observa-se que, na ausência desta variação, parecem seguir o ritmo de luz de seus ancestrais sugerindo um componente genético na sazonalidade reprodutiva (LINCOLN, *et al.* 1990; CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). A principal diferença entre as diversas raças ovinas e as latitudes onde elas são criadas diz respeito ao tempo e magnitude do ciclo de mudanças sazonais como: tamanho testicular, secreção de gonadotrofinas, atividade testicular, produção espermática e comportamento sexual (LINCOLN *et al.*, 1990; DICKSON e SANFORD, 2005).

Não há dúvida de que ter uma estação reprodutiva definida pode ser uma importante estratégia para a sobrevivência de algumas espécies animais (ROSA e BRYANT, 2002). No entanto, o nascimento sincronizado de cordeiros em uma única época do ano, sob o ponto de vista econômico, pode ser um fator gerador de entressafra de produtos ovinos o que tem ocasionado grandes dificuldades do fortalecimento da cadeia produtiva. O consumo de carne ovina vem crescendo de forma importante no Brasil nos últimos anos (SANTOS, 2005), porém parte do mercado interno precisa ser suprido através de importações devido, entre outros fatores, à sazonalidade de produção de cordeiros. O aumento da demanda pela carne ovina tem gerado incremento na comercialização de insumos, matrizes e reprodutores de genética superior. Tendo em vista a procura de animais com excelência em qualidade genética, observa-se grande expansão no mercado de materiais como sêmen e embriões. Este fato tem impulsionado as pesquisas de técnicas aplicadas à reprodução e exigido maior conhecimento sobre fatores que possam influenciar a qualidade de produtos que veiculam o material genético, como é o caso do sêmen.

Outro fator importante da sazonalidade reprodutiva no carneiro é a modificação de parâmetros andrológicos durante as diferentes épocas do ano (KAFI *et al.*, 2004). Através deste exame é possível avaliar a fertilidade de um reprodutor e, portanto, serve como parâmetro para definir o valor reprodutivo do carneiro. Por isso, é imprescindível determinar a variação qualitativa e quantitativa dos padrões

andrológicos que podem ser alterados conforme a época do ano, evitando assim interpretações enganosas ou condenações de reprodutores por suspeitas de alterações patológicas.

Como há poucas publicações sobre o efeito do comprimento do dia em regiões de baixas latitudes em raças ovinas sazonais, não é possível descrever de forma exata como esses animais respondem ao fotoperíodo. A raça Suffolk é conhecida popularmente por apresentar marcante sazonalidade reprodutiva e grande interesse entre os ovinocultores, por isso pode ser um bom modelo experimental para inferências à outras raças sazonais criadas em baixa latitude. Assim, questiona-se se sob o ponto de vista produtivo, a sazonalidade de reprodutores ovinos originados de altas latitudes seria um fator expressivo a ponto de influenciar sua fertilidade em baixas latitudes?

Apesar de atualmente estarem disponíveis inúmeros resultados, hipóteses, comprovações e conhecimentos acumulados através dos estudos de diversos pesquisadores das áreas propostas no presente experimento, muitos questionamentos ainda carecem de respostas. Mesmo utilizando técnicas biotecnológicas que têm possibilitado o conhecimento dos mecanismos biológicos em nível molecular, há muito ainda para ser feito. Publicações científicas recentes sobre a sazonalidade reprodutiva em ovinos no Brasil são escassas e quando se considera especificamente o macho ovino são ainda mais raras. Devido à carência deste tipo de informação científica, muitas vezes os manejos reprodutivos realizados em fazendas produtoras de ovinos são orientadas através de práticas observadas em fazendas vizinhas ou em pesquisas de outros países. As pesquisas de países com tradição na criação de ovinos são, portanto, uma das bases da informação que determina os manejos reprodutivos realizados no Brasil, fato que em alguns casos tem levado a diminuição dos lucros da atividade ou até a sua inviabilidade econômica, já que nem sempre são aplicáveis a sistemas de produção, condições climáticas e raças utilizadas no Brasil.

Por observações constatadas pelos autores deste trabalho e de outros profissionais que também atuam na ovinocultura no Estado do Paraná, é possível verificar uma tendência de ciclicidade reprodutiva de ovelhas lanadas, especialmente das raças Hampshire Down, Suffolk, Texel, Ille de France e Corriedale, nesta região (SOTOMAIOR e LUZ, comunicação pessoal, 2007). Em manejo de rotina no Paraná, as ovelhas são colocadas com os reprodutores a partir de janeiro, sendo os estros



ainda detectáveis até aproximadamente o mês de maio, porém não há informações científicas que comprovem se esta pressuposta “maior fertilidade” ocorre nesta época. Os questionamentos continuam. Será que a maior parte das fêmeas somente apresenta estros nestes meses? Será que esta sincronização de nascimentos não está ocorrendo, em algumas raças, simplesmente porque nos outros meses do ano as ovelhas estão gestando ou lactando? O nascimento concentrado ocorre porque os machos apresentam maior libido e fertilidade no verão e outono? Até que ponto as variações ao longo do ano na qualidade espermática em um mesmo carneiro sob condições constantes de manejo, sanidade e alimentação são fisiológicas ou patológicas? Há, realmente, alteração sazonal na fertilidade destes reprodutores, se sim, qual seria a intensidade e o momento em que ocorrem estas oscilações? O presente trabalho científico, utilizando uma das principais raças e sistema de criação mais utilizado para produção de carne ovina no Paraná, busca responder parte destes questionamentos.

Visando verificar a hipótese de que carneiros adultos da raça Suffolk apresentam resposta sazonal na reprodução também em latitudes baixas, diversos parâmetros relacionados à reprodução masculina foram avaliados ao longo de um ciclo anual completo. Esse trabalho possui vários pontos relevantes e que se complementam em sua essência. Análises qualitativas e quantitativas dos parâmetros avaliados mostram que alguns deles possuem oscilação.

O presente experimento utiliza medidas de vários parâmetros relacionados à reprodução de carneiros da raça Suffolk como critério para avaliar os possíveis efeitos da sazonalidade nesta raça, em baixas latitudes e sob fotoperíodo natural. Os objetivos deste estudo constam a seguir.

- 1 - Caracterizar os efeitos da sazonalidade sobre a função testicular utilizando os seguintes parâmetros:
  - a) Medida da evolução anual da circunferência escrotal em ovinos adultos de massas corporais e idades diferentes, com e sem experiência sexual prévia;
  - b) Avaliação das características quantitativas e qualitativas do sêmen ao longo do ano;
  - c) Determinação mensal dos níveis séricos de testosterona;

- d) Caracterização das diferenças histológicas entre testículos colhidos no momento de maior e de menor circunferência escrotal;
- 
- 2 - Verificar a aplicabilidade de se obter o volume testicular através de equação matemática, utilizando medidas de comprimento e largura escrotal "*in vivo*".
  - 3 - Comparar os padrões atualmente propostos para exames andrológicos em ovinos quando utilizados em raças com sazonalidade em baixa latitude e estabelecer as épocas mais favoráveis para a reprodução e emprego de biotecnologias envolvendo sêmen ovino.
  - 4 - Calcular a produção de doses de sêmen nas diferentes estações, levando em consideração as modificações andrológicas dos reprodutores Suffolk em baixa latitude.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Os ovinos, conhecidos por apresentarem reprodução sazonal, têm despertado o interesse de pesquisadores preocupados em entender os mecanismos que levam a estacionalidade reprodutiva nas diversas espécies. Dos inúmeros trabalhos publicados, a grande maioria tem sido realizada em altas latitudes e alguns apontam evidências de que essa estacionalidade apresenta uma ritmicidade sazonal.

### 2.1 ASPECTOS CRONOBIOLÓGICOS

Ao se propor um estudo baseado nos conceitos da cronobiologia, é necessário entender que existe nos seres vivos uma organização temporal que se manifesta na forma de ritmos biológicos em processos fisiológicos e comportamentais. Os ritmos biológicos incluem fenômenos como os ciclos de divisão celular, frequência cardíaca, ciclo sono/vigília, ciclo de atividade e repouso, ciclos reprodutivos, entre outros. Segundo MARQUES *et al.* (1997), pode-se definir ritmo como sendo um processo que varia periodicamente no tempo, ou a manifestação de um fenômeno que se repete com o mesmo período. O período é, então, o intervalo de tempo em que um ciclo se completa e é representado pela letra grega tau ( $\tau$ ).

A maioria dos seres vivos possui um relógio endógeno capaz de gerar oscilações e transmiti-las ao organismo como um todo através de diversas vias eferentes ou efeitores (HASTINGS *et al.*, 1991). Este relógio biológico (ou oscilador) interage com os ciclos externos e desta interação resulta o que se chama de “sincronização” (ou arrastamento) dos ritmos biológicos. Quem promove a sincronização de um ritmo biológico é o ciclo ambiental, denominado por ASCHOFF (1960) de “Zeitgeber” (neologismo germânico que significa “doador de tempo”).

Os ritmos biológicos mais evidentes são aqueles que possuem periodicidades iguais aos ciclos ambientais. O mais primário deles são os ritmos relacionadas aos movimentos de rotação, onde a Terra gira em torno de seu eixo gerando um ciclo de fases clara e escura. Uma rotação completa é chamada “um dia” (24h) correspondendo a dois nascer-do-sol consecutivos (CIPOLLA-NETO *et al.*, 1988). Sendo assim, os seres vivos evoluíram de forma que precisaram coordenar sua fisiologia e comportamento a um ciclo diário de 24 horas. Devido a isso é possível

identificar, em diversos grupos de organismos, processos rítmicos com duração aproximada desse período, denominados por Franz Halberg em 1959, de “ritmos circadianos” (do latim *circa* = cerca e *diem* = dia) (MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997). Há ainda os ritmos não-circadianos que são aqueles classificados como infradianos, ritmos de baixa frequência e conseqüentemente períodos maiores de 28 horas, e os ultradianos, com ritmos de frequência alta e com períodos menores de 20 horas.

Embora muitos ritmos diários sejam mencionados como circadianos, é necessário ressaltar que um ritmo circadiano só pode ser assim chamado se ele for experimentalmente testado, ou seja, se for caracterizado por meio da expressão de seu ritmo endógeno. Estas observações são possíveis em condições constantes de laboratório, pelo isolamento de um organismo de pistas ambientais. Isso implica, de uma forma geral, em manter organismos noturnos no escuro constante e diurnos em claro constante. Assim, o organismo pode entrar em “livre-curso”, situação na qual ele passa a expressar seu ritmo endógeno, aquele gerado pelo seu relógio biológico. Este ritmo possui uma periodicidade um pouco diferente daquela observada quando sob a influência dos ciclos ambientais. Esses ritmos são a expressão de “relógios biológicos” e são denominados de “circa-ritmos”, como os circadianos, circa-lunares, circa-marés e circanuais (MARQUES *et al.*, 1997). Em condições naturais, quando um organismo está em contato com o ciclo claro/escuro ambiental, ocorre a sincronização e, então, a duração do período do ritmo passa a ser igual à do ciclo ambiental. Nesse caso, o que se mede é um “ritmo observado” que se expressa na forma de padrões diários, mensais, anuais, etc.

A importância da presença do relógio biológico em um organismo está comprovada há várias décadas. Segundo PITTENDRIGH (1960), o sentido de se ter um relógio endógeno auto-sustentado ao invés de apenas um simples mecanismo de resposta direta ao ciclo ambiental, está na necessidade do organismo se preparar antecipadamente para uma determinada atividade. Por outro lado, ele pode reagir diretamente a um estímulo ambiental sem que o relógio biológico seja envolvido e assim responder imediatamente às mudanças ambientais. Este processo chama-se “mascaramento”. Bem diferente dos “Zeitgebers”, que afetam o oscilador provocando a sincronização do relógio biológico, os agentes mascaradores (ou moduladores) provocam reação direta dos sistemas efetores. Sendo assim, o padrão de atividade pode ser modificado por mascaramento positivo, quando aumenta a atividade, ou

negativo, quando a atividade é eliminada ou suprimida. Esses efeitos causados por mascaramento dependem da forma e intensidade dos estímulos externos bem como da sensibilidade do organismo ao estímulo (ASCHOFF, 1960; 1988).

Não há dúvida de que o ciclo geofísico do dia e da noite proporciona um canal de comunicação entre um organismo e seu ambiente. E é através desse canal que não somente as informações diárias são comunicadas aos seres vivos, mas também as informações sazonais e latitudinais. O número de horas de claro (fotofase) e de escuro (escotofase) do ciclo diário (fotoperíodo) fornece sinais temporais para a sincronização das funções internas com informações necessárias para o organismo lidar com as exigências do ambiente externo. E é devido a essa capacidade dos seres vivos em detectar mudanças sazonais, face ao estímulo fotoperiódico, que permite a eles habitarem uma variedade enorme de ambientes e, assim, suas funções biológicas respondem, de forma adaptativa, em um momento específico. Deste modo, a adaptação temporal é de fundamental importância para a sobrevivência de uma espécie, e lhe permite expressar determinadas funções e comportamentos nos momentos em que a situação ambiental seja mais adequada para a sua expressão (BECK, 1980; MARQUES e MENNA-BARRETO, 1997). Pode-se, então, dizer que os elementos que garantem a uma espécie ser temporalmente adaptada são: seu sistema temporal endógeno e sua sensibilidade e responsividade a ciclos ambientais e agentes mascaradores específicos (MARQUES *et al.*, 1997).

## 2.2 RITMOS SAZONAIS E A REPRODUÇÃO EM OVINOS

As diferentes estações do ano e, conseqüentemente, as alterações climáticas cíclicas anuais que ocorrem na Terra são geradas devido à translação e ao eixo de rotação deste planeta ao redor do Sol. A translação é o movimento elíptico que a Terra exerce ao redor do Sol com duração de 365 dias. Ao longo de um ano, os raios solares incidem diferentemente em uma mesma localidade geográfica devido à inclinação de 23° 27' do eixo terrestre (FIGURA 1) em relação ao plano da órbita da Terra ao redor do Sol. Portanto, quanto maior a distância de uma determinada região do trópico ao Equador, maior será a latitude e, conseqüentemente, maior será a diferença entre o número de horas de luz no dia (fotofase) do solstício de inverno e

de verão. A palavra solstício, deriva do latim, sol + sistere (*solstitium*), que significa parado, imobilizado e está associada à idéia de que o Sol estaria estacionário. Este momento marca a época do ano em que o sol atinge o máximo afastamento angular do Equador e determina o momento de ocorrência do dia mais curto e do dia mais longo do ano, respectivamente, nos dias 21 de junho e 21 de dezembro. Estas datas marcam o início das estações de inverno e verão no hemisfério sul ou as estações contrárias no hemisfério norte.

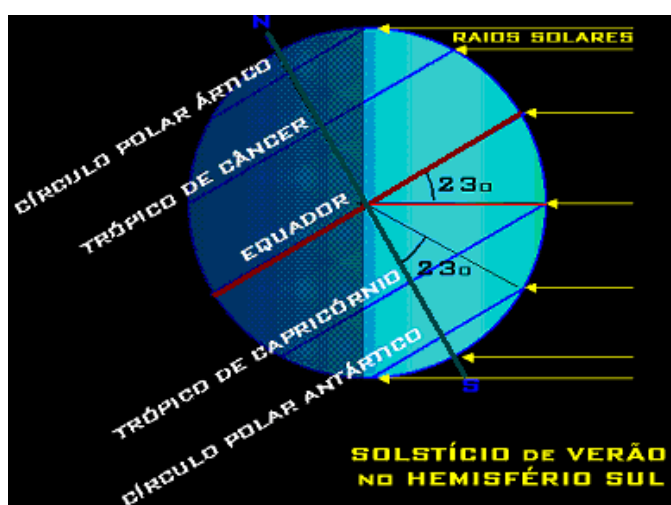


FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO DA TERRA MOSTRANDO COMO OS RAIOS SOLARES INCIDEM DE FORMA DIFERENTE CONFORME A SUA INCLINAÇÃO  
 FONTE: <http://www.observatorio.ufmg.br/equi06.gif>

Equinócio é uma palavra que deriva do latim (*aequinoctium*), significa “noite igual”, e refere-se ao momento do ano em que a duração do dia é igual à da noite sobre toda a Terra. Os equinócios ocorrem nos dias 23 de setembro e 21 de março dando início à primavera e ao outono no hemisfério sul ou as estações contrárias no hemisfério norte.

As mudanças de fotoperíodo e temperatura ao longo do ano são consideradas variáveis ambientais muito importantes em climas temperados, enquanto que os ciclos anuais de chuvas e conseqüentemente disponibilidade alimentar são os fatores preponderantes em regiões tropicais. Isso significa que estas variáveis podem agir como “Zeitgebers” em algumas latitudes e como agente mascarador em outras (MARQUES *et al.*, 1997). Quando estas variáveis atingem níveis críticos, alguns animais podem desenvolver respostas através de uma série

de estratégias como: mudança de hábito alimentar, armazenamento de reservas energéticas, diminuição do metabolismo basal, substituição de pêlos ou plumas, hibernação ou migração (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2005). Outro mecanismo é uma estratégia reprodutiva envolvendo um “método contraceptivo natural” que restringe a atividade reprodutiva à melhor época do ano para assegurar os nascimentos na primavera ou verão quando é mais provável que as condições ambientais promovam boas condições de sobrevivência em regiões temperadas (LINCOLN e SHORT, 1980). Em regiões áridas ou de baixa latitude, a estação de nascimento pode estar mais relacionada à época das chuvas, momento em que o aporte nutricional melhora (BROWN, 1994). Independentemente da latitude não há dúvidas de que as espécies, com resposta sazonal na reprodução, estejam sincronizadas por pistas ambientais mais seguras. Em regiões cada vez mais distantes do equador, ao contrário de outras variáveis ambientais, o fotoperíodo fornece uma pista mais estável sobre as estações já que apresenta um ciclo que se repete de ano para ano. Assim, verifica-se que animais adaptados há longo tempo aos trópicos freqüentemente respondem mais a outros fatores do ambiente que possuem um ciclo anual estável, e não à extensão do dia. Os ovinos são exemplos de animais considerados “de dias curtos” porque a estação reprodutiva inicia quando a fotofase diária está encurtando, momento correspondente ao verão e especialmente ao outono. Todavia a distribuição de partos durante o ano varia claramente conforme a latitude. EVANS e MAXWELL (1987) afirmam que em regiões equatoriais, a atividade reprodutiva pode ocorrer durante o ano todo ou pode estar mais relacionada a temperatura ou as chuvas.

Da mesma forma que, para a caracterização de um ritmo circadiano é necessário conhecer a expressão do caráter endógeno desse ritmo, o mesmo deve ser considerado para os ritmos sazonais. Este conceito é aplicável tanto para os organismos que apresentam várias gerações no ano, quanto a aqueles em que o ciclo de vida possui duração de no mínimo um ano. A sincronização de organismos que possuem várias gerações no ano é particularmente bem estudada nos insetos onde um determinado comprimento de fotoperíodo denominado de “fotoperíodo sensível” induz o organismo a preparar-se antecipadamente para uma estratégia de sobrevivência (diapausa, migração, mudança de forma, cessação da atividade reprodutiva, etc) para ele próprio ou para a sua prole (MARQUES *et al.*, 1997). Isso

significa que o “fotoperíodo sensível” que inicia o desencadeamento de um processo na geração atual pode ter ocorrido ainda numa geração anterior (BECK, 1980).

O caráter endógeno da reprodução em ovinos já foi verificado. Quando mantidos sob regime de claro constante por vários anos, carentes de informação sazonal, ainda mantêm algumas características cíclicas sazonais em sua atividade reprodutiva. Da mesma forma que em outros organismos o período endógeno verificado foi diferente do ano sideral, sendo de aproximadamente 10 meses (WOODFILL *et al.*, 1994; LINCOLN, 2006). Já em condições sincronizadas com fatores ambientais sabe-se que o ritmo em ovinos pode ser modificado quando o regime fotoperiódico muda (WOODFILL *et al.*, 1994). Em condições naturais o prolongamento da fotofase provoca parada da atividade estral e a sua diminuição estimula o desencadeamento de estros nas ovelhas (HULET e SHELTON, 1988). Em contraposição, em carneiros, SCHANBACHER e FORD, (1979) verificaram que a atividade espermática não pára ao longo do ano, porém, o número de espermatozóides produzidos diminui conforme a estação. No entanto, é importante ressaltar que a época e a intensidade em que estas alterações ocorrem diferem conforme a raça e a latitude estudadas.

Outro fato importante já observado em ovinos é que a atividade reprodutiva não é uma função direta do comprimento do dia, mas depende do fotoperíodo do qual o animal originou-se. Dessa forma, uma mudança de regime fotoperiódico pode levar a alterações na fase inicial ou na duração da atividade reprodutiva. Quando ovinos de raça e origem comuns são deslocados para próximo da região equatorial, podem passar por uma estação de cobertura muito maior do que aqueles que permaneceram nas regiões polares (HULET e SHELTON, 1988). O traslado de ovelhas de um hemisfério a outro determina a inversão da estação de nascimentos, respeitando o momento de maior atividade sexual, o outono (ABELLA, 1993). Experimentalmente, regimes artificiais de claro/escuro que reproduzem, em seis meses a variação anual normal de comprimento do dia (fotofase), induzem em seis meses de intervalo, momento de atividade sexual em ovelhas e carneiros. Similarmente, uma alternância constante de dias com fotofases longas e curtas a cada três ou quatro meses induz, algumas semanas depois da mudança de fotoperíodo, a um aumento no tamanho testicular nos carneiros e atividade estral nas ovelhas (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). Outro exemplo de que a história fotoperiódica tem grande importância foi demonstrado por ROBINSON e KARSCH



(1987) ao constatarem aumento nos níveis de LH quando substituíram um regime de claro/escuro com fotofase de 16 para 13 horas em ovelhas; porém, após aumento de 10 para 13 horas na fotofase, houve uma diminuição nos níveis do mesmo hormônio. Com estes resultados, os autores verificaram que a direção da mudança do número de horas de claro à qual os animais estão expostos pode ser um fator importante na variação hormonal além do comprimento da fotofase em si.

De uma maneira geral, a sazonalidade reprodutiva na ovelha é caracterizada por mudanças comportamentais, endócrinas e ovulatórias. Há uma alternância anual entre duas fases distintas. A primeira corresponde ao aparecimento de ciclos estrais regulares e ovulatórios denotados pelo comportamento de cio a cada 17 dias e se a gestação não se desenvolve, ocorre então, a segunda fase, que corresponde a uma estação de anestro caracterizada pela ausência da atividade sexual. Com relação aos machos, estes exibem flutuações sazonais que podem ser verificados por padrões rítmicos no comportamento sexual, atividade hormonal, gametogênese e no volume e peso testiculares (DICKSON e SANFORD, 2005; GÜNDOĞAN, 2007), porém essas variações fisiológicas são menos pronunciadas do que nas fêmeas. Enquanto que ovulação e o estro ficam suspensos durante um período do ano na ovelha, a espermatogênese não cessa no carneiro. Porém, de acordo com alguns pesquisadores, a qualidade seminal se modificada conforme a estação do ano. Esse fato foi observado, por exemplo, por KARAGIANNIDIS *et al.* (2000). Eles verificaram que em latitude 40° N em raças ovinas gregas, a qualidade seminal foi melhor no final do verão e outono e pior na primavera. A sensibilidade dos carneiros ao fotoperíodo é diferente das ovelhas. A atividade sexual do macho é estimulada aproximadamente 30 a 45 dias antes em relação às ovelhas. A vantagem para este estímulo antecipado é que ele determina um alto nível de atividade sexual nos machos no momento em que as fêmeas estão iniciando seus estros.

## 2.3 TEMPORIZAÇÃO CIRCADIANA E SAZONAL

A antecipação de eventos fisiológicos sincronizados com eventos ambientais é uma característica da presença de mecanismos de temporização que possibilitam diversos organismos otimizar sua sobrevivência e seu sucesso reprodutivo. Os principais mecanismos são: o fotoperiodismo e o ritmo circanual intrínseco. Quando

o organismo utiliza o fotoperiodismo ocorre um registro das mudanças fotoperiódicas ao longo do ano e que são traduzidas em alterações fisiológicas e comportamentais temporais ritmicas. Um evento cíclico, então, é formado por mudanças fisiológicas induzidas pela fotoindução e pela fotorrefratariedade (LINCOLN *et al.*, 2003). O outro mecanismo que possibilita a antecipação de eventos em relação ao ambiente é, como visto anteriormente, a existência de um ritmo circanual intrínseco. Animais selvagens de vida longa expressam ciclos anuais que inclusive se mantêm inalterados mesmo quando privados por anos de pistas ambientais, demonstrando que neles o ciclo circanual é predominante. Porém, em outras espécies, como a ovina, tanto o ritmo circanual quanto o fotoperiodismo são reguladores da sazonalidade e, neste caso, o ambiente comandará se o ritmo endógeno será expresso, tendo assim um efeito de modulação do ritmo intrínseco (WOODFILL *et al.*, 1994).

As bases anatômicas, celulares e hormonais envolvidas no controle reprodutivo pelo fotoperíodo são parcialmente conhecidas (JOHNSON e EVERITT, 2000; LINCOLN *et al.*, 2006). Na maioria dos mamíferos, os ritmos circadianos e sazonais endógenos podem ser sincronizados e/ou modulados por fatores exógenos, em especial a luminosidade, que pode agir tanto como agente mascarador quanto sincronizador.

Os estímulos luminosos são primariamente recebidos pela retina que contém fotorreceptores necessários para um controle fotoperiódico. As informações luminosas são transmitidas para os núcleos supraquiasmáticos (NSQs) através de um trato monossináptico chamado trato retino-hipotalâmico (ROSA e BRYANT, 2003). Os NSQs são formados por dois agrupamentos de neurônios localizados no hipotálamo, acima do quiasma ótico e adjacente ao terceiro ventrículo (JOHNSON e EVERITT, 2000), que funcionam como relógios biológicos gerando ritmos circadianos e sazonais. Sendo assim, os NSQs estão envolvidos não somente na geração de ritmos circadianos que definem o dia e a noite como também da medida de intervalos de tempo, mais especificamente do comprimento da noite, característicos de cada estação do ano.

O relógio dos NSQs possui um mecanismo celular autônomo baseado na ativação de transcrições de uma série de genes conhecidos como genes-relógio, que compõe a base da função circadiana nos NSQs, mas também em tecidos periféricos (LINCOLN *et al.*, 2003). Estas transcrições ocorrem em intervalos

periódicos. Em resumo, os genes *period* (*per1*, *2* e *3*) e *criptocromo* (*cry1* e *2*) são ativados por heterodímeros compostos por outros dois fatores circadianos CLOCK e BMAL1. As proteínas PER e CRY associam-se para reprimir a expressão dos genes *per* e *cry*, gerando assim um mecanismo do tipo alça de retroalimentação negativa. Esta alça determina um padrão cíclico da expressão gênica que apresenta uma periodicidade circadiana. Além disso, os genes *per1* e *per2* são sensíveis a estímulos fóticos transmitidos para os NSQs via aferências da retina. É esse mecanismo que garante a sincronização entre o oscilador circadiano endógeno e o dia solar que está, portanto, agindo como “Zeitgeber”. Este mecanismo forma também a base para a regulação fotoperiódica do funcionamento do relógio, que garantirá a sincronização ao longo das diferentes estações do ano.

O relógio do NSQ sincroniza ciclos sazonais através do controle que exerce sobre a secreção noturna de melatonina, um neuro-hormônio da glândula pineal (ARENDR, 1998). A melatonina é uma indolamina sintetizada a partir de aminoácido triptofano convertido a serotonina. A melatonina é um produto direto do metabolismo da serotonina. O sistema monoamina-oxidase pode inativar a serotonina ou convertê-la em melatonina na pineal, neste local a serotonina é convertida em *N* – acetilserotonina (pela *N* – acetiltransferase) e em seguida em melatonina. Este hormônio é inativado no fígado (EILER, 2006). Como a melatonina somente pode ser sintetizada durante o escuro, a duração de seu pico reflete diretamente o comprimento da noite, cuja duração é longa no inverno e curta no verão, constituindo-se assim, em um verdadeiro calendário endócrino para regulação fotoperiódica de tecidos-alvo (GERLACH e AURICH, 2000). Esse mecanismo é uma característica fortemente conservada nos mamíferos o que proporciona o surgimento de adaptações sazonais importantes (HASTINGS e FOLLETT, 2001). De uma forma geral, já está reportado que a melatonina circulante transmite informações fotoperiódicas aos tecidos-alvo por meio de receptores específicos (proteína G) presentes nesses tecidos. Hipotálamo e pars tuberalis da hipófise são exemplos de tecidos que apresentam respostas com padrão sazonal, as quais regulam respectivamente alterações lactotrófico/metabólicas e reprodutivas. Os sinais de saída neural e hormonal desses e de outros tecidos sensíveis à melatonina acionam uma série de adaptações fisiológicas às estações do ano. Torpor, hibernação e migração, bem como infertilidade, deposição de gordura e alterações nas taxas metabólicas e no apetite estão entre as respostas possíveis. Todavia, a base

genética desta cascata de respostas sazonais não é conhecida. No entanto, sabe-se que tecidos periféricos exibem padrões circadianos da expressão de genes-relógio embora essas expressões sejam dependentes do NSQ para a manutenção de sua integridade. Pelo menos para um órgão, a hipófise, esta dependência do relógio central é mediada via sinal de melatonina (VON GALL *et al.*, 2002). Outra característica conhecida é a modulação da amplitude do ciclo circadiano da expressão de *per* na hipófise pelo comprimento da noite, ou seja, pela duração do sinal da melatonina. Estas descobertas levam a crer que a regulação sazonal na fisiologia envolva mudanças orquestradas na expressão de genes relógios e de outros genes deles dependentes, em tecidos específicos.

#### 2.4. NEUROENDOCRINOLOGIA DA REGULAÇÃO SAZONAL REPRODUTIVA EM CARNEIROS

Em ovinos, infusões de melatonina que mimetizam o fotoperíodo de verão são marcadamente mais efetivas na sincronização de ritmos reprodutivos sazonais que as infusões que simulam dias curtos. Estes dados são consistentes com a visão que o fotoperíodo de verão, agindo via melatonina, fornece o “Zeitgeber” para ciclos fisiológicos sazonais (LINCOLN, 2006). O fotoperiodismo depende do modo como a duração de melatonina é decodificada nos tecidos responsivos, os quais possuem células-calendário que governam aspectos específicos da fisiologia sazonal. Genes-relógio estão implicados nos mecanismos moleculares que decodificam a duração do sinal de melatonina. Esta conclusão é baseada em estudos da *pars tuberalis* da hipófise, onde são expressos altos níveis de receptores de melatonina, levando à secreção de substâncias que provavelmente regulam a secreção de prolactina pelos lactotrofos, na adenohipófise (HAZLERIGG *et al.*, 2001). A secreção de prolactina é aumentada no verão e diminuída no inverno e contribui, juntamente com outros hormônios, na regulação de várias funções fisiológicas e inclusive promove a atividade gonadal exercendo influências tanto na função espermatogênica quanto esteroidogênica em carneiros (JABBOUR e LINCOLN, 1999).

A duração do pico diário de melatonina é capaz de modular a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo. Entretanto, a rota

neuroanatômica que comunica o sinal circadiano à liberação de GnRH é pouco entendida (JOHNSON e EVERITT, 2000).

GROSSE *et al.*, (1993) observaram que o aumento no tempo de secreção diária de melatonina está associado a uma diminuição na liberação de GnRH e subsequente regressão das gônadas em animais de dias longos. Porém, o mesmo sinal é seguido por aumento na liberação de GnRH e ativação das gônadas em animais de dias curtos. A administração de melatonina em carneiros estimula a liberação de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) pela hipófise e ativa a função testicular (LINCOLN, 1994), mas outros fatores estão envolvidos nesta resposta, como observaram ANDERSON e BARRELL (1998) ao verificar que a remoção da tireóide em veados causava fotorrefratariedade sobre as respostas de produção de gonadotrofinas. Após o estímulo do hipotálamo pela melatonina, o GnRH chega à hipófise anterior através de um sistema porta hipotálamo-hipófise, modulando a liberação de LH e FSH. A influência do fotoperíodo na secreção de GnRH é refletida por mudanças circanuais na liberação de LH (GERLACH e AURICH, 2000). Os pulsos de GnRH são sucedidos por pulsos de LH e os pulsos de testosterona sucedem os pulsos de LH, mas a amplitude das respostas difere conforme a época do ano (RHIM *et al.*, 1993). Estes experimentos confirmam a hipótese que a sazonalidade modifica as relações e respostas entre as unidades hipotálamo-hipófise e hipófise-gônadas.

Todavia, a liberação de LH e FSH não é determinada exclusivamente por estímulos hipotalâmicos, uma vez que os níveis tônicos de FSH e LH também são controlados por mecanismos retrógrados de hormônios esteróides gonadais, especialmente o estrógeno e andrógenos (REEVES, 1988). Os andrógenos produzidos nas células de Leydig agem retroativamente no hipotálamo e hipófise sustentando a ação do FSH sobre a espermatogênese e controlando a produção de LH (GARNER e HAFEZ, 1988). A testosterona age no hipotálamo para diminuir a frequência dos pulsos de GnRH e, na hipófise anterior, para diminuir sua resposta ao GnRH na produção de LH. Os mecanismos pelos quais os esteróides executam a retroalimentação negativa na distribuição dos pulsos de GnRH e LH não são completamente entendidos (SCOTT *et al.*, 2003). TILBROOK *et al.* (1999) demonstraram que a retroalimentação negativa dos níveis de testosterona na secreção de LH ocorre em nível hipotalâmico e que esta resposta não é influenciada pelo fotoperíodo. Em contraste, a testosterona e a inibina agem na hipófise

suprimindo a secreção de FSH e estas respostas são afetadas pela estação do ano. A inibina é um hormônio produzido nas células de Sertoli em resposta ao FSH e estimula a esteroidogênese nas células de Leydig. A inibina, juntamente com a testosterona, está envolvida na complexa regulação por retroalimentação da função hipofisária (BRINSKO, 2004).

Os hormônios gonadotróficos da hipófise regulam a função endócrina dos testículos e são os principais reguladores da espermatogênese. O FSH está intimamente ligado ao início da atividade dos túbulos seminíferos para a produção de espermatozóides, enquanto que o LH é um dos controladores da função endócrina nas células intersticiais de Leydig (LINCOLN *et al.*, 1990). Os receptores de FSH das células de Sertoli, dependendo dos níveis deste hormônio, regulam a espermatogênese ao estimular a produção dos inúmeros fatores produzidos por elas (O'DONNELL *et al.*, 2001). As células de Leydig são responsáveis pela secreção de andrógenos, especialmente a testosterona e também de outros esteróides como o estrógeno (ABNEY, 1999). Estudos em humanos mostraram que a administração de estrógenos pode aumentar a supressão de gonadotrofinas, indicando que este hormônio também tem uma função de retroalimentação negativa da secreção de gonadotrofinas (HANDELSMAN *et al.*, 2000). Segundo SAUNDERS *et al.* (1997), o estrógeno atua inibindo as enzimas esteroidogênicas das células de Leydig que são necessárias para a síntese de testosterona ou alterando os receptores de LH. O que denota sua capacidade de mediar a resposta da célula ao LH. A frequência dos pulsos de LH é considerada como um fator regulador muito importante nas mudanças sazonais de secreção de testosterona em carneiros adultos. DICKSON e SANFORD (2005) observaram que a concentração de testosterona foi fortemente correlacionada com a frequência dos pulsos de LH em diversas raças estudadas.

Há muito tempo sabe-se que a quantidade de horas de luz por dia influencia a esteroidogênese testicular (GOMES e JOYCE, 1975). O decréscimo na luz do dia (outono) tem um efeito positivo na produção de esteróides nos testículos dos ovinos. Este fato foi observado por SCHANBACHER e FORD (1979) que verificaram elevação da testosterona sérica a partir da quarta semana de fotoperíodo artificial decrescente. Segundo RHIM *et al.*, (1993) o aumento significativo de testosterona durante a estação reprodutiva ocorre devido primariamente ao aumento da resposta do testículo ao LH.

## 2.5 MODIFICAÇÕES SAZONAIS NA ESPERMATOGÊNESE E HISTOLOGIA TESTICULAR E AS RELAÇÕES COM O TAMANHO TESTICULAR

A espermatogênese é um processo dinâmico contínuo de transformação de células germinativas primordiais em espermatozóides, que ocorre em intervalos precisos e sob uma sequência ordenada nos túbulos seminíferos dos testículos. As células germinativas primordiais se estabelecem nos túbulos seminíferos nos estágios da vida fetal masculina. Ao longo da vida fetal e no pós-natal precoce o tamanho do testículo cresce lentamente. Os gonócitos apresentam limitada proliferação mitótica e contribuem pouco para o aumento do tamanho testicular nesta fase. Porém, na puberdade há um rápido aumento do tamanho testicular devido a: formação da luz nos túbulos seminíferos, aumento da atividade e tamanho das células de Sertoli, aumento da secreção endócrina das células de Leydig e à recuperação da atividade mitótica das células germinativas, as quais iniciam o processo de formação dos espermatozóides (JOHNSON e EVERITT, 2000).

O ciclo espermatogênico começa com uma célula mãe ou espermatogônia do tipo A, que constitui o ponto de partida de uma série espermatogênica. As espermatogônias estão presentes entre as células de Sertoli, muito próximas à base da membrana do túbulo. Antes da conclusão da transformação de espermatogônia em espermatozóide, outras séries de multiplicação se iniciam no mesmo lugar do túbulo seminífero; assim, qualquer secção do túbulo mostra várias gerações de células germinativas superpostas (ORTAVANT *et al.*, 1984).

Em ovinos adultos, o processo de divisão das espermatogônias inicia em uma sequência de tempo e em uma posição precisa ao longo do túbulo seminífero formando, assim, ondas de maturação celular. Portanto, uma porção do túbulo que contém um tipo de associação celular é seguida por uma porção do túbulo que contém um estágio precedente ou subsequente de tipo celular. Cada série completa de associação celular determina o ciclo dos túbulos seminíferos que inicia em intervalos regulares de 10,57 dias no carneiro (CARDOSO e QUEIROZ, 1988). Em um corte histológico do túbulo seminífero é possível observar oito tipos diferentes de associações constantes entre os tipos de células germinativas. O conjunto destes estágios cobre os 10,57 dias, sendo a duração da espermatogênese igual ao tempo transcorrido por cinco séries destes estágios, totalizando em média 42,28 dias.

A espermatogênese pode ser dividida em duas fases: a espermatocitogênese e a espermiogênese. A espermatocitogênese (período mitótico e meiótico) compreende as multiplicações das espermatogônias (mitose) que originam os espermátocitos primários (diplóides) e a também meiose que origina os espermátocitos secundários e finalmente as espermátides haplóides.

Cada espermatogônia tem o potencial teórico de produzir 48 espermátocitos primários, porém se observa uma produção de aproximadamente 24 espermátocitos, que pode ser diminuída para menos de dez durante a primavera em raças ovinas sazonais (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). O principal estágio afetado é o de espermatogônia intermediária (COURROT, 1967). Segundo JOHNSON e EVERITT (2000) uma espermatogônia A1 produz em seis mitoses 64 espermátocitos primários que poderiam gerar até 256 espermatozóides se não houvesse degeneração.

A segunda fase da espermatogênese, a espermiogênese (período metamórfico), compreende as transformações morfológicas importantes da espermátide até espermatozóide, não havendo, portanto, neste processo nenhuma multiplicação celular. SCHANBACHER e FORD (1979) verificaram que na espermiogênese houve pouca perda celular por degeneração devido a mudanças sazonais, uma vez que ocorreu similaridade do número de espermátides redondas e espermátides maduras em carneiros expostos a dias longos. No processo de espermiogênese, as espermátides redondas se transformam em espermátides alongadas, desenvolvendo-se o acrossoma, a cauda e a peça intermediária que contém mitocôndrias importantes na propulsão. A espermiogênese se completa com a formação do espermatozóide e sua liberação da célula de Sertoli para a luz do túbulo pelo processo chamado de espermiação.

As células de Sertoli são os elementos somáticos do epitélio seminífero. O núcleo é irregular, possui formato triangular que varia durante o ciclo seminífero determinando a arquitetura deste epitélio (COLE e CUPPS, 1984). Estas células são, provavelmente, os principais responsáveis pela organização temporal e espacial das células espermatogênicas. Supõe-se que no macho adulto estas células não se dividam e, portanto, seu número não varie (ORTAVANT *et al.*, 1984). Porém, o volume, o conteúdo lipídico, a morfologia nuclear podem variar ciclicamente nestas células (JOHNSON *et al.*, 2000). Alterações degenerativas em células de Sertoli, semelhantes àsquelas que ocorrem durante estresse térmico, foram verificadas em ovinos no inverno (GASTEL *et al.*, 1995).



As diversas fases do processo de espermatogênese descritas anteriormente produzem tipos celulares que podem ser diferenciados em cortes histológicos. O estudo da histologia testicular e suas diversas combinações celulares entre diferentes épocas do ano geram informações importantes sobre o efeito da sazonalidade na espermatogênese.

Se a modificação sazonal afeta a atividade espermatogênica é de se esperar que ocorram mudanças na circunferência escrotal (CE) e, conseqüentemente, no peso testicular (LINCOLN *et al.*, 1990). Na produção comercial de ovinos, as mensurações de CE são utilizadas como critério de seleção de reprodutores (MORAES, 1997) e podem refletir sobre o desempenho de prolificidade das suas filhas, já que parece haver uma correlação positiva entre maior CE e número de ovulações (LAND, 1973).

As mudanças no peso/volume testicular devido às mudanças de luminosidade do ambiente são conseqüência de fenômenos degenerativos dentro do processo de espermatogênese, o qual pode afetar a quantidade de espermatozóides secretados na luz dos túbulos seminíferos (HOCHEREAU de REVIERS *et al.*, 1976). A magnitude e o momento em que o processo é afetado dependerão, entre outros fatores, da raça e latitude onde a raça se encontra. ORTAVANT *et al.* (1984) verificaram que testículos de carneiros Ile-de-France (raça sazonal) variaram de 180g para 300g do inverno para o final do verão. DICKSON e SANFORD (2005) observaram na raça Suffolk que o pico de circunferência escrotal ocorreu no mês de setembro (outono) com uma média de 36,1cm. As mudanças no tamanho testicular refletem as alterações visualizadas histologicamente pelas alterações nos diâmetros dos túbulos seminíferos e modificam a produção espermática, uma vez que o tecido tubular corresponde de 70 a 83% de todo o tecido testicular (WROBEL *et al.*, 1995). O diâmetro dos túbulos seminíferos é considerado um bom parâmetro para a avaliação da habilidade reprodutiva, sendo que se espera uma modificação significativa no diâmetro dos túbulos em ovinos no decorrer do ano.

Os comandos hormonais são as chaves reguladoras da espermatogênese e também da massa e tamanho testicular em carneiros adultos, sendo que os principais hormônios envolvidos são o FSH e a testosterona. Segundo McLACHLAN *et al.* (1996), a ação destes hormônios nas células de Sertoli é impedir a apoptose das células germinativas e potencializar sua divisão e/ou diferenciação.

Os receptores de LH nas células de Leydig são capazes de detectar os níveis deste hormônio suficientes para induzir a produção de andrógenos, os quais atuam nos receptores androgênicos do epitélio seminífero para controlar a espermatogênese (O'DONNEL *et al.*, 2001).

Cada hormônio desempenha uma função única na diferenciação e proliferação das espermatogônias, sendo que a testosterona promove a formação e diferenciação dos espermatócitos em espermátides redondas e alongadas (KILGOUR *et al.*, 1994) e também desempenha função chave no sucesso ou falha nas divisões mitóticas da espermatogônia, o que colabora entre outros fatores com a eficiência da espermatogênese (LINCOLN, 1989). O FSH induz, via células de Sertoli, o aumento da massa testicular através da estimulação do desenvolvimento espermatogônico. A testosterona parece regular os primeiros estágios de desenvolvimento espermático, enquanto que o FSH regula os estágios de espermatogônia intermediária a espermatócito primário (DICKSON e SANFORD, 2005). SCHANBACHER e FORD (1976) já sugeriam que o crescimento testicular em carneiros submetidos a fotoperíodo artificial decrescente poderia ser uma resposta ao aumento das concentrações das gonadotrofinas que ocorre neste período.

O estrógeno é outro hormônio importante para a regulação da espermatogênese, apesar de não se conhecer como ele responde à sazonalidade. A biossíntese do estrógeno é catalisada pela aromatase citocromo P450 que pode ser expressa em vários tecidos, os quais podem então sintetizá-lo: testículos, ovários, placenta, fígado fetal, tecido adiposo e algumas áreas do cérebro como o hipotálamo (O'DONNEL *et al.*, 2001). O controle da espermatogênese, por este hormônio, é feita através da estimulação da mitose espermatogônica, prevenindo a apoptose especialmente em espermatócitos e espermátides (PENTIKAINEN *et al.*, 2000), ou constituindo parte do maquinário endócrino e bioquímico envolvido no processo de formação do acrossoma (MORENO *et al.*, 2000). COOKE *et al.* (1994) também verificaram que os níveis altos de hormônios da tireóide são capazes de inibir a proliferação e estimular a diferenciação das células de Sertoli, as quais são essenciais para o início da espermatogênese e para a expressão máxima da capacidade espermatogênica. Sabe-se que outros hormônios estão envolvidos nas funções das células de Sertoli. O'DONNEL *et al.* (2001) demonstrou que a administração de estradiol exógeno afeta a proliferação e função destas células levando a permanente defeitos na função reprodutiva.

## 2.6 ALTERAÇÕES SAZONAIS NA QUALIDADE DO SÊMEN

Na tentativa de caracterizar possíveis variações sazonais, a avaliação da qualidade do sêmen tem sido de grande interesse e pode ser usada como critério de avaliação da adaptabilidade de raças a diversas regiões ou climas. Outro interesse no conhecimento da qualidade seminal ao longo do ano diz respeito ao seu aproveitamento nos diferentes processos biotecnológicos aplicados à reprodução (BICUDO, 1998). O ejaculado de um ovino normal é caracterizado por volume em torno de um a dois mililitros e total de espermatozóides ejaculados variando entre dois e seis bilhões. As variações de duração do dia controlam a atividade espermatogênica no carneiro, e alguns autores observaram que ocorria uma melhora na produção e qualidade espermática no outono em relação a primavera e verão (HULET e SHELTON, 1988; KAFI *et al.*, 2004). SCHANBACHER e FORD (1979) sugerem que a quantidade de espermatozóides produzidos varia conforme o fotoperíodo já que este desencadeia mecanismos que aumentam a degeneração de algumas classes de células germinativas ou controlam o número de espermatogônias que entram no ciclo espermático.

Além do volume e concentração dos ejaculados, outros parâmetros físicos mais comumente avaliados no sêmen são: turbilhonamento, vigor e motilidade progressiva. O turbilhonamento se expressa por ondas de evolução dos espermatozóides em um pequeno aumento microscópico com sêmen puro. O vigor representa a intensidade de movimentação, ou seja, a velocidade de deslocamento dos espermatozóides e a motilidade progressiva, avaliada em porcentagem, determina quantos espermatozóides se deslocam retilineamente (FONSECA *et al.*, 1992). Considerando vários parâmetros, KAFI *et al.* (2004) em latitude 29°N em raça considerada pouco sazonal (Karakul) observaram que o sêmen de melhor qualidade foi produzido no final do verão e outono. BICUDO (1998) verificou nítida queda de qualidade espermática durante o inverno em ovinos Ideal em latitude 22°S; no entanto, o sêmen manteve nível compatível à aplicação de biotécnicas da reprodução.

Vários pesquisadores têm descrito uma ampla variedade de anormalidades morfológicas que afetam os espermatozóides, mas ainda há poucas evidências experimentais claras de relação entre caracteres morfológicos específicos e o grau de fertilidade. Todavia, sabe-se que a integridade da célula espermática é um

requisito imprescindível para sua fertilidade. Classificações de anormalidades espermáticas foram propostas por cientistas com a finalidade de se conhecer a origem e possivelmente a causa de cada defeito. BLOM (1973) sugeriu agrupar as anormalidades em maiores e menores, sendo estes menos importantes e aqueles relacionados com um estado anormal dos testículos e epidídimos.

Os defeitos espermáticos podem estar aumentados em amostras de sêmen por inúmeros fatores, entre eles: nutrição deficiente ou desbalanceada, idade, defeitos genéticos, temperaturas ambientais extremas, enfermidades, hipoplasias, atrofia ou degenerações testiculares e mudanças fotoperiódicas (SALISBURY *et al.*, 1982). CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) relatam que a diminuição significativa da atividade espermatogênica em carneiros na primavera está associada com um aumento de anormalidades nos espermatozóides. Em alguns reprodutores, a porcentagem de células anormais pode chegar a 70% em alguns meses do ano, resultando em infertilidade temporária destes animais.

## 2.7 EFEITOS MODULADORES DA SAZONALIDADE REPRODUTIVA

Em raças originadas em médias e altas latitudes, o fotoperíodo é conhecido por ser o principal fator que controla a sazonalidade reprodutiva em pequenos ruminantes. Outros fatores como: variáveis climáticas, regime alimentar, tosquia, interação social agem como moduladores (agente mascarador) da atividade reprodutiva (HULET e SHELTON 1988; CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991) com maior interferência em raças originadas em baixas latitudes.

Segundo ABELLA (1993) a atividade sexual é diferente entre raças ovinas, existindo uma repetibilidade marcada da estação de nascimentos para um mesmo genótipo em um ambiente particular. Estas variações ocorrem devido à seleção natural exercida no local de origem de cada raça e da seleção artificial que o homem impõe ao determinar cruzamentos em determinado período do ano.

Mesmo em raças cuja reprodução é primariamente controlada por fotoperíodo, carneiros podem mostrar algumas respostas relacionadas à mudança nutricional. Bons níveis nutricionais alteram o peso e estado corporal do animal, melhorando a taxa ovulatória através de modificações nos níveis de gonadotrofinas

e interatuam com o fotoperíodo determinando a frequência nos pulsos de GnRH liberados pelo hipotálamo ABELLA (1993).

HÖTZEL *et al.* (2003) verificaram ganho de peso em carneiros Merino e Suffolk após um incremento no aporte nutricional, porém não foi detectada nenhuma resposta endócrina ou crescimento testicular induzido por incremento nutricional fora da estação reprodutiva em machos Suffolk. Raças mais sazonais como esta, respondem aos efeitos nutricionais da mesma forma que raças menos sazonais, mas somente quando o fotoperíodo permite. No controle da capacidade espermatogênica, o fotoperíodo é mais importante que a nutrição em carneiros Suffolk, enquanto que o inverso ocorre na raça Merino. As causas destas variações não são completamente entendidas pela falta de trabalhos que demonstrem quais são de fato os agentes sincronizadores ou mascaradores dos ritmos. Mas, é provável que o genótipo influencie o caminho como o sinal de melatonina é traduzido no sistema nervoso central. No entanto, em um trabalho realizado por MARTIN *et al.* (2002) onde os níveis de melatonina foram semelhantes para as raças Merino e Suffolk em todas as dietas. Isso indica que a melatonina pode estar sob influência direta do fotoperíodo em ambas as raças atuando mais como sincronizador do que modulador. Haja vista que, mesmo em raças consideradas menos sazonais e criadas em baixas latitudes observa-se que uma melhora no aporte nutricional pode diminuir os efeitos da sazonalidade reprodutiva, mas não pode eliminá-la (BIELLI *et al.*, 1999) o que demonstra o caráter modulatório da alimentação.

Alterações na dieta podem provocar grandes mudanças na fertilidade de ovelhas e carneiros, assim como a subalimentação produz efeitos adversos na libido e tamanho testicular a longo e curto prazos. Por outro lado, efeitos deletérios da superalimentação também podem ser observados. Dietas ricas em energia e proteína têm uma correlação positiva com a circunferência e peso escrotal, assim como com o peso e volume do testículo. Porém, animais excessivamente gordos acumulam gordura na região do plexo pampiniforme, levando a problemas de termorregulação testicular e menor qualidade espermática (FOURIE *et al.*, 2004).

## 2.8 PADRÃO ANDROLÓGICO E VARIAÇÕES SAZONAIS DA QUALIDADE DO SÊMEN VISANDO AS BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO

O objetivo do exame andrológico de carneiros é avaliar e classificar sua habilidade reprodutiva potencial. Este processo deve incluir a avaliação das condições físicas gerais e genitais e das suas características de sêmen. Durante a avaliação escrotal do exame andrológico, a medida de CE tem sido empregada como indicadora da função espermato gênica potencial e serve como critério de seleção genética para identificação de reprodutores mais prolíferos (FERREIRA *et al.*, 1988). Segundo PURVIS *et al.* (1988), as vantagens em selecionar indivíduos com maior tamanho testicular estão relacionadas a dois aspectos fundamentais: redução do número de animais com alterações na função testicular e esperada resposta correlacionada com a taxa de ovulação e fertilidade das filhas. Vários trabalhos científicos foram realizados para definir a medida mínima de CE na qual não haverá comprometimento da capacidade reprodutiva de ovinos (BRAUN *et al.*, 1980; JOBIM *et al.*, 1989; MORAES e OLIVEIRA, 1992; BAGLEY, 1997). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA) (FONSECA *et al.*, 1992) sugere como parâmetro de CE, para exame andrológico de ovinos de corte, resultados obtidos por JOBIM *et al.* (1989) de medidas de CE realizadas em quatro raças ovinas (Hampshire Down, Suffolk, Ile de France, Texel), durante exposição agropecuária. As medidas médias nesta mensuração de CE variaram de 30,4 a 35,65 cm. BAGLEY (1997) sugere que os borregos devem possuir no mínimo a 30 cm de CE, enquanto carneiros adultos, para serem aprovados como aceitáveis em exame andrológico, devem ter 33 cm de CE. Este pesquisador orienta que a medida da CE fornece uma boa indicação da resistência reprodutiva do carneiro, mas lembra que esta medida varia conforme a época do ano e com a condição corporal. Muitos estudiosos encontraram medidas de CE inferiores a 30 cm em diversas raças estudadas conforme a época do ano, como: MIES FILHO *et al.* (1993) 28,0 cm em Hampshire Down; GASTEL *et al.* (1995) 26,3 cm em Corriedale; EL-ALAMY *et al.* (2001) 27,8 cm em Dorset. Portanto, avaliando os resultados acima, verifica-se que o parâmetro de CE mínima de 30 cm para qualquer época do ano e qualquer raça ainda é discutível, uma vez que as modificações de CE são fisiológicas e reversíveis conforme o fotoperíodo.

Com relação à avaliação do sêmen, o exame andrológico contempla as fases de avaliação morfológica e avaliação física seminal, através das seguintes características: volume do ejaculado, concentração espermática, turbilhonamento, vigor e motilidade. As características morfológicas dos espermatozóides são inspecionadas e as porcentagens de defeitos espermáticos são inferidas conforme o tipo de defeito ou o local do espermatozóide aonde aparecem (cabeça, peça intermediária ou cauda). Os padrões mínimos desejáveis sugeridos pelo CBRA (FONSECA *et al.*, 1992), independentemente da época do ano, são: volume entre 0,3 a 3 ml por ejaculado, turbilhonamento grau três, concentração de  $2 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$  espermatozóides/ml, defeitos maiores totais menos que 10% e defeitos menores totais menos que 15%, sendo que o total de defeitos não deve ultrapassar 20%.

Para BAGLEY (1997), muito cuidado deve ser tomado ao condenar um reprodutor em avaliação seminal única, uma vez que este representaria um momento reprodutivo e não pode ser válido para toda vida reprodutiva do animal. Se um carneiro apresentar alteração de saúde, sua capacidade reprodutiva poderá estar comprometida durante os próximos dois a três meses. Já que os espermatozóides colhidos iniciaram sua maturação há dois meses. Verificou-se que há variações importantes nos padrões andrológicos especialmente no que diz respeito à patologia espermática conforme a estação. Maiores percentuais de defeitos foram encontrados em fevereiro (verão) no Rio Grande do Sul em Hampshire Down (MIES FILHO *et al.*, 1993), enquanto que, nos Estados Unidos MICKELSEN *et al.* (1982) verificaram taxas altas de anormalidades espermáticas em várias raças no mês de setembro (outono).

O interesse nas biotécnicas da reprodução é voltado, sobretudo, ao uso de reprodutores ou matrizes de alto padrão genético. Uma das técnicas mais utilizadas com esta finalidade é a inseminação artificial com sêmen congelado. Esta técnica permite a comercialização do produto entre localidades distantes e permite armazenamento do sêmen por longos períodos, entre outros fatores. Tendo em conta que características de volume do ejaculado e concentração espermática são importantes para determinar o número de doses de sêmen, que podem se produzidas por reprodutor, em cada época do ano, pesquisas foram realizadas para avaliar a variação destas características conforme a estação, a raça e a latitude. Algumas pesquisas apontam que os volumes e as concentrações dos ejaculados

são maiores no outono do que na primavera (KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000; GUNDOGAN, 2007).

De um modo geral, CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) sugerem que as principais características reprodutivas que devem ser levadas em conta, na seleção de reprodutores para congelamento de sêmen são, principalmente, a CE e o número de espermatozoides normais.



### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. LOCAL DE REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado de abril de 2005 a maio de 2006. Os carneiros foram alocados na Fazenda Experimental do Cangüiri, localizada no Município de Pinhais – PR, a 893 m de altitude (IPARDES, 2005), sob a longitude 49°16'23"W e latitude 25°25'40"S. Nesta localidade, a amplitude do fotoperíodo é de 13 horas e 44 minutos de luz para 10 horas e 16 minutos de escuridão no solstício de verão e 10 horas e 33 minutos de luz e 13 horas e 27 minutos de escuridão no solstício de inverno, havendo uma diferença de 3 horas e 11 minutos entre o dia mais longo e o dia mais curto do ano (OBSERVATÓRIO NACIONAL, 2007 – ANEXO 1).

#### 3.2. ANIMAIS

Todos os reprodutores foram mantidos sob condições intensivas de criação e permaneciam confinados em aprisco elevado do chão durante a noite e em baias coletivas parcialmente cobertas durante o dia, sob condições de iluminação natural. A alimentação consistia de silagem de milho, sal mineralizado e água fornecidos *ad libitum*. Também eram fornecidos aproximadamente 300 gramas de concentrado balanceado por animal por dia. Esta dieta foi constante durante todo o experimento para que fossem eliminadas possíveis interferências de ofertas oscilantes de alimentação nas características reprodutivas estudadas.

Para a verificação de possíveis variações dos parâmetros relacionados a reprodução de reprodutores da raça Suffolk, ao longo de um ciclo anual completo, um total de 15 animais foi utilizado. Levando-se em conta a massa corporal, a idade e a experiência sexual prévia desses carneiros, foram constituídos dois grupos como descritos a seguir.

- a) Grupo cS: formado por 12 carneiros da raça Suffolk puros de origem, com aproximadamente 12 meses de idade no início do experimento e massa corporal média de 51,51 Kg. Estes animais eram mantidos em um único lote em baias anexas ao aprisco onde as fêmeas permaneciam à noite. Cada carneiro foi condicionado ao uso da vagina artificial para as colheitas de

sêmen quinzenais realizadas durante quatro meses anteriores ao início do experimento e nunca permaneceram com ovelhas para coberturas naturais. Os animais foram acompanhados quinzenalmente de abril de 2005 a março de 2006. Para análise das variações histológicas sazonais, seis animais escolhidos aleatoriamente foram abatidos e os testículos foram colhidos no momento em que apresentaram a menor CE. Os outros seis animais continuaram sendo avaliados em relação aos parâmetros estudados até o momento em que apresentaram a maior CE, quando também foram abatidos para a colheita dos testículos.

- b) Grupo rS: formado por três reprodutores selecionados como padreadores puros de origem da raça Suffolk que possuíam experiência sexual prévia e eram mantidos em baias individuais a aproximadamente 70 metros das instalações destinadas aos animais do grupo cS e das fêmeas. Este grupo foi avaliado mensalmente de abril de 2005 a maio de 2006 e foi mantido afastado da reprodução durante o experimento.

Para que condições sanitárias não interferissem com as respostas reprodutivas sazonais, durante todo o experimento todos os animais foram inspecionados e pesados mensalmente para que mantivessem condições normais de saúde. O principal problema sanitário na região onde o experimento foi desenvolvido é a infecção parasitária gastrintestinal, sendo a contaminação por *Haemonchus contortus* e a resistência parasitária as maiores preocupações (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1996 e 2004). Para que não houvesse interferência do parasitismo nas características reprodutivas, os machos foram mantidos em confinamento com acesso a solário de piso de cimento e inspecionados quinzenalmente para o grau de anemia através do método FAMACHA® (BATH *et al.* 2001). Neste método utiliza-se a avaliação clínica da coloração da conjuntiva de ovinos para definir escores que variam de 1 a 5. Estes escores foram baseados na porcentagem de hematócrito e são definidos conforme QUADRO 1. Durante o experimento os animais que apresentavam coloração de conjuntiva classificada em escores 3, 4 ou 5 nas avaliações quinzenais foram submetidos a tratamento com anti-helmínticos.

QUADRO 1 – ESCORES DE CLASSIFICAÇÃO DE CONJUNTIVA SEGUNDO A AVALIAÇÃO CLÍNICA E PORCENTAGEM DE HEMATÓCRITO PARA UTILIZAÇÃO DO MÉTODO FAMACHA®  
 FONTE: BATH *et al.*, 2001

| Categoria FAMACHA® | Avaliação clínica da cor da conjuntiva | Hematócrito (%) |
|--------------------|--|-----------------|
| 1                  | Vermelha                               | $\geq 28$       |
| 2                  | Vermelha rósea                         | 23 - 27         |
| 3                  | Rósea                                  | 18 - 22         |
| 4                  | Rósea pálida                           | 13 - 17         |
| 5                  | Branca                                 | $\leq 12$       |

Vale ressaltar que o uso de anti-helmínticos foi necessário duas vezes no decorrer do experimento utilizando-se uma associação de moxidectin (0,2 mg/Kg) e closantel (7,5 mg/Kg). Estes anti-helmínticos foram testados previamente no lote e a porcentagem de redução de ovos por grama de fezes (OPG) foi de 91,5%.

Durante as avaliações também foi feita a classificação da condição corporal, de cada carneiro, avaliada através da palpação das apófises espinhosas e transversas da primeira vértebra lombar usando escores de 1 a 5 (RUSSEL *et al.* 1969). Foram classificados como escore 1 os animais muito magros, cujas apófises espinhosas e transversas eram proeminentes e bem definidas; escore 2 (animais magros) animais que apresentavam as apófises transversas de forma suave e arredondada; escore 3 animais que possuíam as apófises espinhosas de forma suave e arredondada e o músculo lombar mais volumoso e com boa cobertura de gordura; escore 4 animais cuja apófise espinhosa só pôde ser detectada através de pressão e as apófises transversas não puderam ser sentidas (animais gordos). O escore 5 representou os animais obesos cujo músculo lombar apresentou-se muito volumoso com uma camada de gordura muito espessa.

### 3.3. PARÂMETROS AVALIADOS

O planejamento de protocolos experimentais na cronobiologia deve levar em conta as mudanças das condições fisiológicas e comportamentais que um

organismo sofre a medida que o tempo passa. Medidas e observações em repetidas vezes são necessárias no menor intervalo possível, porém, dependem do tipo de fenômeno estudado (MARQUES E MENNA-BARRETO 1997).

### 3.3.1 Mensuração da circunferência escrotal (CE)

A circunferência escrotal foi mensurada com uma fita métrica flexível na maior porção da circunferência sem pressionar os testículos para baixo. As medidas foram facilmente obtidas após a contenção dos animais em estação (FIGURA 2). Devido à presença de lã no escroto, sempre que esta atingia mais que 0,5 cm de comprimento era realizada a apara da lã da região com tesoura de tosquia para que não houvesse interferência nas mensurações.



FIGURA 2 - MENSURAÇÃO DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL EM OVINO DA RAÇA SUFFOLK COM O USO DE FITA MÉTRICA FLEXÍVEL PINHAIS (PR)

### 3.3.2 Avaliação do volume testicular e espessura do escroto

Os valores de volume testicular foram obtidos através de cálculo matemático (volume calculado = VC) a partir das mensurações de largura e comprimento de cada testículo *in vivo* durante as avaliações quinzenais com auxílio de um paquímetro (FIGURA 3). Durante as medições do comprimento testicular, tomou-se o cuidado de se excluir a cabeça e cauda dos epidídimos e na largura testicular excluiu-se o corpo do epidídimo. Para se obter o VC dos testículos foi utilizada como equação básica fórmula de cálculo de volume de um elipsóide segundo (GRANVILLE *et al.*, 1956):

$$a = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{b}{2} \times \left[ \frac{c}{2} \right]^2$$

Onde:  $a$  = volume do testículo (ml)  
 $b$  = comprimento do testículo (cm)  
 $c$  = largura do testículo (cm)

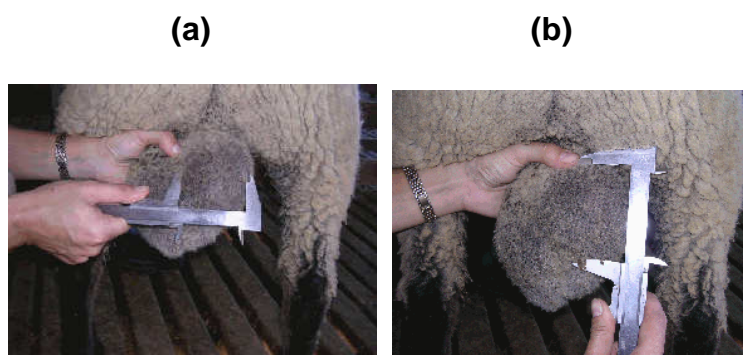


FIGURA 3 - MENSURAÇÃO DE LARGURA (a) E COMPRIMENTO (b) TESTICULAR EM OVINO DA RAÇA SUFFOLK UTILIZANDO PAQUÍMETRO. PINHAIS (PR).

Os valores de volume testicular obtidos através da equação (VC) foram comparados aos volumes obtidos pelo deslocamento de água (FIGURA 4), como descrito a seguir. Após o abate, foram colhidos os testículos direitos de seis carneiros do grupo cS no momento de maior e de menor CE, conforme descrito no item 3.3.5. Logo após a colheita, os órgãos foram mantidos dentro do escroto (para que não ocorresse desidratação do tecido), armazenados sob refrigeração e avaliados morfológicamente no dia seguinte à colheita para mensuração do volume testicular, espessura do escroto e para verificar a presença de possíveis anormalidades. As espessuras dos escrotos foram aferidas com paquímetro. O volume de cada testículo foi mensurado depositando-se a peça em Becker de 600 ml contendo água destilada em temperatura ambiente. Considerou-se como volume do testículo o valor em mililitros do deslocamento de água no Becker.



FIGURA 4 – MENSURAÇÃO DO VOLUME TESTICULAR ATRAVÉS DO DESLOCAMENTO DE ÁGUA EM BECKER

### 3.3.3 Determinação da concentração sérica de testosterona

As concentrações de testosterona sérica foram estudadas para observar possíveis variações ao longo do ano e se essas variações apresentavam relação com o fotoperíodo ou com as características dos ejaculados. Estudou-se também a magnitude e momento de ocorrência destas variações.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular nos carneiros dos grupos cS e rS em intervalos de 30 dias, sempre à tarde. O intervalo entre a primeira e a última amostra de sangue colhida não ultrapassou 30 min. As amostras previamente identificadas foram armazenadas em caixa térmica em temperatura ambiente e dentro de 3 horas após a colheita foram centrifugadas e o soro estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

A quantificação da testosterona foi feita através do método de enzima imunoenensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) (BROWN *et al.*, 2004). Antes de iniciar os ensaios foi necessário validar o método proposto de quantificação e dosagem para testosterona de ovinos.

Utilizando o ensaio de validação é possível verificar se há similaridade imunogênica entre o anticorpo utilizado na técnica e o antígeno a ser dosado, já que o anticorpo foi produzido contra a forma plasmática da testosterona humana. Assim sendo, o mesmo deve ser testado para verificar a sua capacidade de detectar a testosterona ovina. Neste estudo, para validação, foi utilizado o ensaio de paralelismo. Através deste ensaio verifica-se a similaridade imunogênica e determina-se qual a diluição apropriada das amostras para quantificação e

dosagem. Para isso utilizou-se uma mistura (“pool”) das amostras a serem testadas, diluídas 1:1 de forma seriada por doze vezes, até se chegar em 1:2048. A curva formada é chamada curva de validação da amostra e se esta for paralela à curva padrão do ensaio significa que existe similaridade imunogênica entre antígeno e anticorpo e o método de quantificação e dosagem pode ser utilizado (BROWN *et al.*, 2004).

A curva de validação das amostras para testar testosterona ovina foi feita utilizando-se 56 amostras de soro, colhidas dos dois grupos de carneiros (cS e rS) do experimento. As microplacas (NUNC Immuno TM plates, Maxisorp) foram cobertas com 50µl de anticorpo anti-testosterona (R156/7; Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) diluído 1:7500 e acondicionada a 4°C, por pelo menos 12 horas.

A curva padrão foi preparada a partir de testosterona humana (SIGMA) na concentração de 600 pg/poço, considerada o padrão mais alto, diluída serialmente 1:1 com solução de ensaio de ELISA (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; NaCl; BSA; pH 7,00) oito vezes até chegar em uma concentração de 2,3 pg/poço, considerada o padrão mais baixo. O hormônio conjugado testosterona-HRP (Coralie Munro – Universidade da Califórnia, Davis, CA, USA) foi diluído 1:20.000 e mantido em 4°C até o momento do ensaio.

A solução do substrato enzimático foi preparada imediatamente antes de sua adição na microplaca e consistia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5M; ABTS (Calbiochem, ABTS<sup>TM</sup> Chromophore, Diammonium Salt) e solução de substrato para ELISA (ácido cítrico; pH 4,00).

A microplaca após coberta com anticorpos foi lavada cinco vezes com solução de lavagem de ELISA (NaCl; Tween 20) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Após a lavagem, foram pipetados 50µl das soluções dos padrões, em triplicata; 50µl das soluções dos controles e das amostras, em duplicatas e 50µl da solução do marcado enzimático testosterona – HRP em todos os poços, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi incubada durante duas horas, em temperatura ambiente, sem agitação. Todo o processo de pipetagem teve média de 6 minutos, não ultrapassando um período de tempo de 10 minutos. Posteriormente à incubação, seguia-se novamente a lavagem da microplaca e foram adicionados 100µl da

solução do substrato enzimático em cada poço, exceto nos poços considerados como branco.

A microplaca foi agitada em agitador Multi-Pulse Vortexer (modelo 099A VB4, 50/60Hz – Glass-Col®), sem pulso e em 300 rpm até que os poços considerados como zeros chegassem em densidade óptica (OD) de 1,0, quando era feita a leitura da absorbância em 405 nm, no leitor de microplaca (TECAN).

A sensibilidade dos ensaios foi de 78pg/ml. Os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram < 10%. Após correção dos resultados para a diluição de cada amostras (1:2 ou 1:4), os resultados foram expressos em nMol/L.

### 3.3.4 Avaliação das características seminais

Os animais do grupo cS tiveram amostras de sêmen colhidas em intervalos de 15 dias para serem quantificadas as possíveis variações na qualidade seminal durante o ano. As colheitas foram feitas através de vagina artificial, utilizando-se uma ovelha em anestro como manequim.

As amostras de sêmen foram mantidas nos copos coletores em banho-maria a 37°C e avaliadas imediatamente após a colheita. O turbilhão foi classificado em escores de 0 a 5 e avaliado em microscópio ótico com aumento de 40 vezes, depositando-se uma gota de sêmen puro sobre lâmina aquecida a 37°C. A motilidade progressiva foi classificada em valores percentuais, e o vigor espermático em escores de 0 a 5, depositando-se entre lâmina e lamínula, uma gota de sêmen diluído em 1 ml de solução fisiológica aquecida a 37°C sob um aumento de 100 vezes (FONSECA *et al.*, 1992). O volume do ejaculado foi avaliado através de pipeta graduada.

Dez microlitros de sêmen de cada amostra foram homogeneizados com dois mililitros de solução formol-citrato (HORN *et al.*, 2002), perfazendo uma diluição de 1:200 para posterior mensuração da concentração e morfologia espermática. Estas amostras foram identificadas e armazenadas em microtubos.

A partir do sêmen diluído em formol-citrato foram feitos esfregaços em lâminas de vidro posteriormente corados pelo método de Cerovsky (CEROVSKY, 1976) e contadas 200 células por lâmina em microscópio ótico (Olympus BX 50) com



aumento de 1000 vezes. As alterações morfológicas espermáticas foram classificadas em defeitos maiores e menores (FONSECA *et al.*, 1992) (QUADRO 2).

A concentração espermática foi mensurada em espectrofotômetro (Metrolab 330) em 570 nm depois da padronização da curva de leitura ( $r = 0,97$ ) comparada à contagem em câmara de Neubauer. A validação da metodologia consta no ANEXO 2. Para a padronização da leitura em espectrofotômetro foram utilizadas vinte e três amostras de sêmen diluído 1:200 submetidas à contagem em câmara de Neubauer. Cada lado da câmara era preenchido com 10  $\mu$ l de sêmen diluído, após 10 minutos eram contados os espermatozóides contidos dentro de 10 quadrados pequenos incluindo aqueles cujas cabeças apresentavam-se apenas sobre a linha superior e esquerda do quadrado. Para se obter o número de espermatozóides por mililitro de ejaculado, depois da contagem, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$a = \frac{b}{1/c \times d/25 \times 1/10}$$

$a$  = número de espermatozóides (por ml)

$b$  = número de espermatozóides contados

$c$  = taxa de diluição (1:200)

$d$  = número de quadrados contados (10)

1/10 = altura da câmara

QUADRO 2 - ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE ESPERMATOZÓIDES DE CARNEIROS  
FONTE: FONSECA *et al.*, (1992)

| DEFEITOS MAIORES                      | DEFEITOS MENORES             |
|---------------------------------------|------------------------------|
| Acrossoma                             | Acrossoma desprendido        |
| Espermatozóide subdesenvolvido        | Gota distal                  |
| Cabeça isolada patológica             | Cabeça gigante               |
| Cabeça estreita na base               | Cabeça curta                 |
| Cabeça piriforme                      | Cabeça larga                 |
| Cabeça pequena anormal                | Cabeça pequena               |
| <i>Pouch formation</i>                | Peça intermediária abaxial   |
| Gota citoplasmática proximal          | Inserção retroaxial          |
| Formas teratológicas                  | Inserção oblíqua             |
| Peça intermediária em saca-rolhas     | Cauda dobrada com gota anexa |
| Pseudogota                            | Cauda enrolada               |
| Outros defeitos de peça intermediária |                              |
| Cauda fortemente dobrada              |                              |

### 3.3.5 Análise histológica e morfométrica testicular

Com o objetivo de mensurar os diâmetros dos túbulos seminíferos nos momentos de maior e de menor CE e para realizar a contagem dos diferentes tipos celulares da linhagem germinativas nos mesmos momentos foi realizada a análise histológica e morfométrica dos testículos.

Seis carneiros do grupo cS foram abatidos através de insensibilização elétrica seguida de sangria uma semana depois do dia em que a circunferência escrotal atingiu o valor máximo médio. Os outros seis animais do lote foram abatidos dez dias depois do momento em que a circunferência escrotal atingiu um valor mínimo. Os testículos esquerdos foram rápida e assepticamente removidos. Amostras de tecido medindo aproximadamente 1 x 1 x 0,5 cm foram colhidas de seis regiões testiculares (médio e latero dorsal, médio e latero medial, e médio e latero ventral) e mantidos em solução de formalina 10% para estudos histológicos.

Para avaliação histológica, fragmentos testiculares já fixados em formalina 10%, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico por 1 hora cada, a partir de álcool 70% até o absoluto. A diafanização foi realizada em xilol e a infiltração e emblocagem em parafina histológica à 58°C (BEÇAK e PAULETTE, 1976). Foram depositados dois fragmentos em cada lâmina perfazendo três lâminas por testículo, contemplando-se, desta forma, os seis fragmentos colhidos de diferentes regiões testiculares. Os cortes de 5 µm foram corados em Hematoxilina-Eosina. As lâminas submetidas a estas colorações, foram desidratadas, diafanizadas e montadas em bálsamo.

As lâminas foram avaliadas e as estruturas estudadas foram medidas com o auxílio do software Image Pró Plus<sup>®</sup> utilizando-se microscópio Olympus BX 50. Túbulos seminíferos que se apresentavam com corte transversal e, portanto, bem arredondados e com lúmen definido foram escolhidos para se obter a medida média dos seus diâmetros (KNIGHT, 1977), o número de camadas celulares e o diâmetro da camada. Quinze túbulos, por fragmento testicular, foram mensurados perfazendo 90 túbulos seminíferos medidos por testículo. Como seis testículos foram obtidos em época de grande desenvolvimento testicular e outros seis no momento de menor circunferência escrotal, no total foram avaliados 540 túbulos seminíferos por grupo experimental. Células de Sertoli e da linhagem germinativa foram classificadas e quantificadas em uma área, estabelecida pelo software, correspondente a um quarto

dos mesmos túbulos avaliados quanto ao diâmetro tubular. As células dos túbulos seminíferos, conforme o aspecto morfológico, foram classificadas em: células de Sertoli, espermatogônias, espermátócitos primários e espermátides alongadas ou espermatozóides (DELLMAN e WROBEL, 1982).

### 3.4 PADRÃO ANDROLÓGICO E VARIAÇÕES SAZONAIS DA QUALIDADE DO SÊMEN VISANDO AS BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO

As características andrológicas avaliadas e descritas nos itens 3.2.1 e 3.2.3 deste trabalho foram tabuladas para mensurar as variações sazonais destas características e propor possíveis padrões para o exame andrológico de ovinos Suffolk na latitude de 25°25'40"S.

As diluições sugeridas e a quantificação do provável número de doses de sêmen congelado por carneiro foram calculadas, levando-se em consideração a congelação em palhetas de 0,25 ml e número mínimo de espermatozóides por palheta de 100 milhões. Também, para efeito de estimativa do número possível de doses por mês de sêmen congelado, foram padronizadas duas colheitas de sêmen diárias, sendo cinco colheitas semanais com descanso de dois dias a cada sete. Portanto, o número de doses estimadas no mês foi obtido pela multiplicação do número de doses obtidas por ejaculado multiplicado por 40. Este padrão foi estabelecido considerando questões práticas de dias de trabalho em central de colheita e congelação de sêmen.

O cálculo de diluição de sêmen para congelação foi realizado conforme as equações descritas abaixo:

- Volume do ejaculado  $\times$  concentração de espermatozóides/ml = número de espermatozóides/ejaculado
- Número de spz/ejaculado : 100 milhões (dose inseminante) = número de doses
- Número de doses  $\times$  0,25 ml (volume da palheta) = volume total (sêmen + diluente)
- Volume total (sêmen + diluente) - volume do ejaculado = volume de diluente necessário para diluição

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para compreender melhor a influência do fotoperíodo sobre o padrão sazonal na reprodução de carneiros Suffolk, utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA). Todavia, primeiramente foi verificado se os dados seguiam uma distribuição normal através do teste Shapiro-Wilk. O Teste de Tukey foi aplicado para contrastar os valores obtidos por ANOVA, sempre que os  $p$ -valores fossem menores que 5% ( $p < 0,05$ ). Utilizou-se a ANOVA em dados de medições como a CE observada ao longo do ano e, nos estudos de histologia como nas medidas dos diâmetros dos túbulos seminíferos e da espessura da camada de células germinativas.

Para verificar a existência de correlação entre diferentes variáveis, dois testes foram utilizados, um paramétrico e outro não paramétrico. O teste paramétrico foi a Correlação de Pearson e o teste não-paramétrico, a Correlação de Spearman. Em ambos os testes, as correlações foram consideradas estatisticamente significativas quando os  $p$ -valores se apresentassem menores que 5% ( $p < 0,05$ ). O teste paramétrico foi utilizado para relacionar dados de medições: a CE com a fotofase, a CE com a massa corporal, e a CE com o volume testicular. O teste não-paramétrico utilizou-se para correlacionar os títulos de testosterona com a CE e confrontar dados de contagens como os das variáveis do sêmen: concentração espermática, motilidade, volume do ejaculado, motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento.

Para analisar os valores referentes às contagens de espermatogônias, espermatócitos, espermátides redondas, espermátides alongadas/espermatozóides e células de Sertoli, o teste utilizado foi o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e, como nos testes supracitados, considerou-se significativo quando o resultado indicasse  $p$ -valores menores que 5% ( $p < 0,05$ ).

Todas as análises do presente estudo foram efetuadas utilizando o pacote estatístico "R" disponível gratuitamente na internet (ver site: <http://cran-r.c3sl.ufpr.br>).

## 4 RESULTADOS

Durante os 12 meses de avaliação todos os animais apresentaram boas condições de saúde geral. Somente o carneiro número 701 necessitou uma desverminação extra. A condição corporal dos lotes não foi inferior ao escore 3 e nem superior a 4 o que indicou bom estado sanitário e nutricional.

### 4.1 CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE) E SUA RELAÇÃO COM FOTOPERÍODO

As mensurações de CE permitiram observar modificações sazonais no tamanho testicular independente da idade dos animais avaliados. Foram observadas mudanças significativas na CE conforme o mês de mensuração. Os menores valores desta medida foram detectados no mês de julho para o grupo cS (27,63 cm) e entre julho e agosto para o grupo rS (30,00cm e 29,75cm). Já os maiores valores foram observados no mês de março para ambos os grupos, sendo 37,67cm para cS e 41,0 para rS (ANEXO 3).

O menor valor individual observado no grupo cS foi de 23 cm (julho) e o maior valor foi de 40,5 cm (março). No grupo rS o menor CE individual foi 28,5 cm no mês de agosto e o maior CE foi de 42 cm no mês de março (ANEXO 4). Estes valores individuais máximos e mínimos coincidiram com os meses de menor e maior média de CE dos lotes. É importante ressaltar que a partir do mês de setembro apenas metade do grupo cS foi avaliada devido ao abate para obtenção dos testículos de seis animais na fase de menor circunferência escrotal (julho).

Para o grupo cS a diferença entre as médias do mínimo de tamanho testicular (27,63 cm) e do ápice (37,67 cm) foi de 10,04 cm, correspondendo a um aumento médio de 36,34% na medida da CE ao longo dos meses de agosto a março. Os animais de três anos (rS) apresentaram um crescimento de 11,25 cm entre os valores máximos e mínimos de CE.

No ANEXO 5 pode ser verificado um resumo de alguns aspectos das medidas de circunferência. Nota-se que a alteração desta medida foi significativa ( $p < 0.001$  em cS e  $p < 0.05$  em rS) entre os meses de maior e menor CE, respectivamente julho e março para os grupos de animais com um ano (cS) e para os animais com três anos (rS).

Houve sincronismo no momento e na magnitude das modificações de tamanho da CE entre os animais do mesmo grupo durante um ciclo anual completo. Este sincronismo ocorreu também quando foram comparados os dois grupos avaliados (cS e rS) (FIGURA 5). As correlações das mudanças nos valores de CE em relação à variação no fotoperíodo foram significativas no grupo cS ( $r = 0,74$ ;  $p < 0.01$ ) e no grupo rS ( $r = 0,60$ ;  $p < 0.05$ ). A fase de menor tamanho testicular ocorreu aproximadamente um mês após o solstício de inverno correspondendo ao mês de julho. Observou-se que o desenvolvimento máximo ocorreu aproximadamente três meses após o solstício de verão, quando abruptamente os valores começaram a declinar.

Considerando que o crescimento testicular ocorreu desde o final de julho, o intervalo de tempo necessário para os testículos alcançarem o máximo de crescimento foi de oito meses, porém a diminuição da CE até o valor médio mínimo foi mais rápida e ocorreu em apenas em quatro meses. Dessa forma, o intervalo entre picos (máximo e mínimo) não foi simetricamente distribuído entre os meses do ano, já que um ocorreu em julho e o outro em março tanto para o grupo cS quanto para rS.

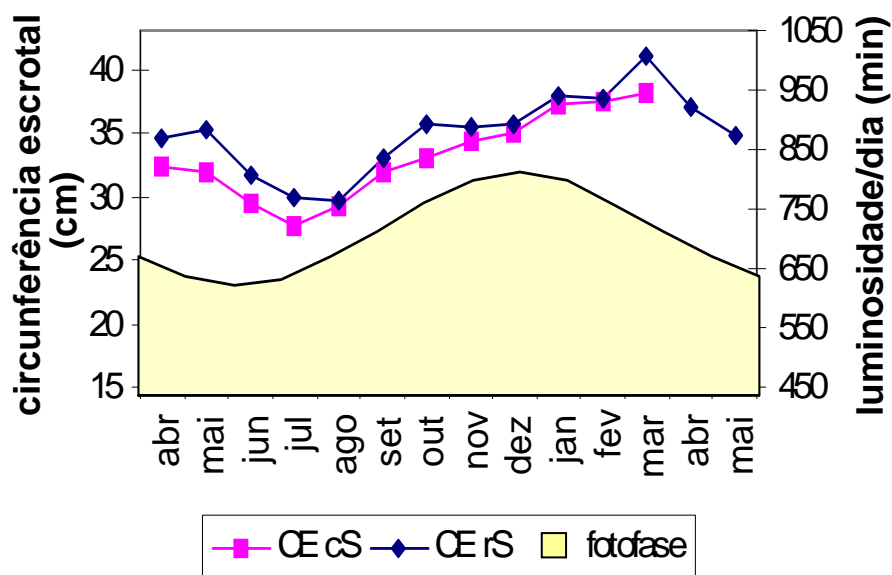


FIGURA 5 – RELAÇÃO ENTRE A LUMINOSIDADE DIÁRIA E A CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL MÉDIA (CE) DE CARNEIROS (Cs) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. HOUVE CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA ENTRE CE E FOTOFASE ( $p < 0,01$  PARA cS E  $p < 0,05$  PARA rS). PINHAIS (PR).

Alterações significativas na CE ( $p < 0,05$ ) puderam ser notadas especialmente quando se os dados foram agrupados por estação do ano (TABELA 1), entretanto, não houve diferença entre os dois grupos na mesma estação. As menores médias ocorreram no inverno e as maiores médias foram verificadas no verão para os dois grupos.

TABELA 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL DE CARNEIROS (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL CONFORME A ESTAÇÃO DO ANO EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

| ESTAÇÃO DO ANO          | Circunferência escrotal (cm) |                           |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                         | Cs                           | rS                        |
| verão (JAN-FEV-MAR)     | 37,36 ± 0,5 <sup>a</sup>     | 38,92 ± 1,81 <sup>a</sup> |
| outono (ABR-MAIO-JUN)   | 31,19 ± 1,5 <sup>b</sup>     | 33,83 ± 1,84 <sup>b</sup> |
| inverno (JUL-AGO-SET)   | 29,97 ± 2,2 <sup>c</sup>     | 30,92 ± 1,81 <sup>c</sup> |
| primavera (OUT-NOV-DEZ) | 34,15 ± 1,03 <sup>d</sup>    | 35,67 ± 0,14 <sup>d</sup> |

NOTA: letras diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre linhas e colunas

Como esperado, a massa corporal média dos animais diferiu ( $p < 0,001$ ) entre os grupos cS e rS (FIGURA 6). Os resultados das aferições mensais da massa para o grupo cS e o rS nos meses de estudo constam no ANEXO 6. Apesar da diferença significativa na média anual das massas entre os grupos estudados, os valores de CE entre cS e rS apresentaram um sincronismo entre involução e crescimento testicular nos diferentes meses (FIGURA 5), para ambos os grupos.

No grupo dos carneiros cS houve um ganho médio de 29,56 Kg em massa corporal durante os 12 meses de avaliação, o que não diferiu da média de ganho de peso nos carneiros de três anos de idade (rS) que foi de 23,6 Kg (ANEXO 6). Todavia, foi constatado que mesmo com o aumento linear de massa durante esses 12 meses, houve uma diminuição na CE de março a julho para os dois grupos. Durante a involução da CE, não se verificou correlação de massa e CE tanto para o grupo cS (FIGURA 7) quanto para o grupo rS (FIGURA 8), já que as massas continuaram aumentando mas a CE apresentou declínio. Os  $p$ -valores das correlações (entre CE e massa) e conseqüentemente os coeficientes de Pearson mostraram-se baixos ( $r = 0.282$  em cS e  $r = 0.574$  em rS) nestes meses. No grupo cS, o declínio do tamanho testicular de abril até julho (ANEXO 3) foi de 5,17cm, o que corresponde a uma diminuição de 15,80%, apesar do aumento médio de 15,9% na

massa corporal (ANEXO 6). Nos carneiros rS essa diminuição foi de 4,75cm, ou seja, de 13,48% enquanto que a massa aumentou em média 23,6Kg.

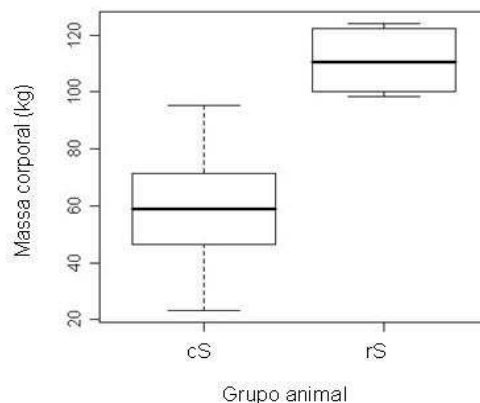


FIGURA 6 – REPRESENTAÇÃO EM “BOX PLOTTING” DESCREVENDO OS VALORES DA MASSA CORPORAL DE CARNEIROS SUFFOLK A PARTIR DE UM ANO DE IDADE (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E DE TRÊS ANOS (rS) (n=3), DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40"S. HÁ DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE AS MÉDIAS DOS DOIS GRUPOS ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR).

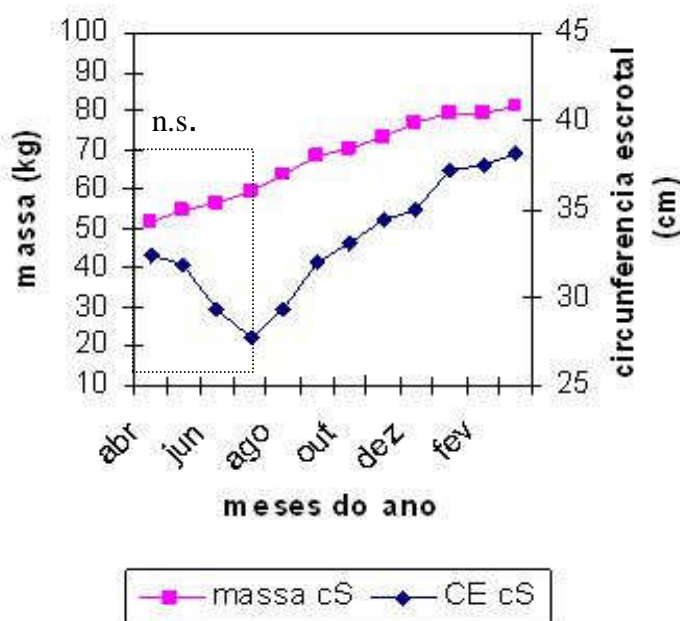


FIGURA 7- MODIFICAÇÕES MENSAIS NA MASSA CORPORAL MÉDIA E CIRCUNFERÊNCIA TESTICULAR (CE) DE CARNEIROS SUFFOLK A PARTIR DE UM ANO DE IDADE (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40"S (n.s. NÃO HÁ CORRELAÇÃO;  $p > 0,05$ ). PINHAIS (PR).



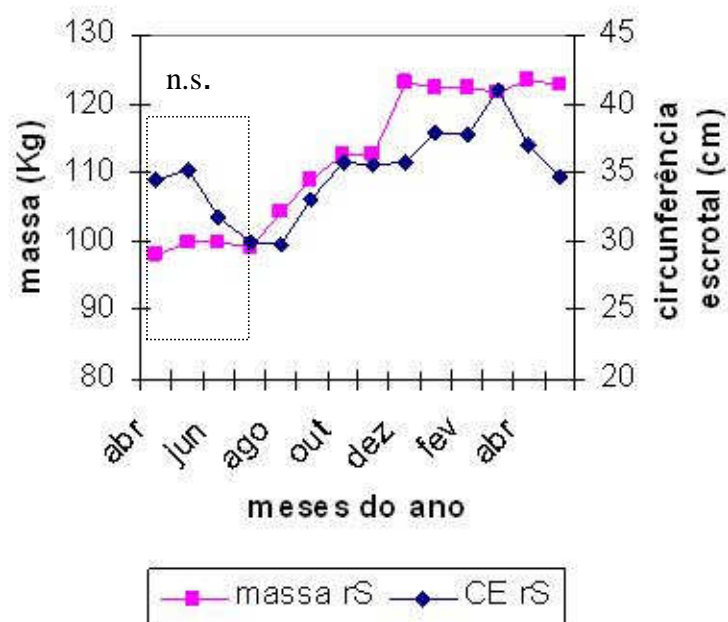


FIGURA 8 – MODIFICAÇÕES MENSAIS NA MASSA CORPORAL E CIRCUNFERÊNCIA TESTICULAR (CE) DE REPRODUTORES SUFFOLK COM TRÊS ANOS DE IDADE (rS) (n=3) DE ABRIL DE 2005 A MARÇO DE 2006 EM LATITUDE 25°25'40"S. (n.s. DENOTA QUE NÃO HÁ CORRELAÇÃO;  $p>0,05$ ). PINHAIS (PR).

#### 4.2 VOLUME TESTICULAR (VT)

Nas avaliações morfológicas de escrotos e testículos colhidos, constatou-se que a medida média da espessura do escroto dos 12 animais abatidos foi de 0,2 cm. Para que o volume do escroto fosse excluído e, portanto, não interferisse no cálculo de volume testicular, optou-se por subtrair 0,4 cm (correspondente a 0,2 cm de espessura de escroto em cada lado da medida com o paquímetro) nos valores de largura e de comprimento do testículo quando substituídos na equação. Portanto, houve a necessidade de adaptação da equação inicialmente proposta para que os cálculos fossem mais fiéis à medida de volume exata do órgão. A equação que passou a ser utilizada foi a seguinte:

$$a = \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{b-k}{2} \times \left[ \frac{c-k}{2} \right]^2$$

Onde:  $a$  = volume do testículo (ml)  
 $b$  = comprimento do testículo (cm)  
 $c$  = largura do testículo (cm)  
 $k$  = 0,4 (cm)

Para se averiguar a veracidade do cálculo, foram comparados os valores calculados de VT, considerando as medidas *in vivo* do dia do abate dos 12 carneiros com o volume obtido pelo deslocamento de água no Becker ao se imergir o testículo direito que havia sido colhido para análise morfológica. O valor médio obtido através da equação para o testículo direito dos 12 carneiros foi de 188,89 ml, enquanto que o volume médio obtido pelo deslocamento de água foi de 180,5 ml. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos pelo deslocamento de água e os volumes calculados ( $p = 0,1788$ ). A correlação entre os valores do VT calculado e VT observado pelo deslocamento de água foi de  $r = 0,97$  ( $p < 0,05$ ) (FIGURA 9).

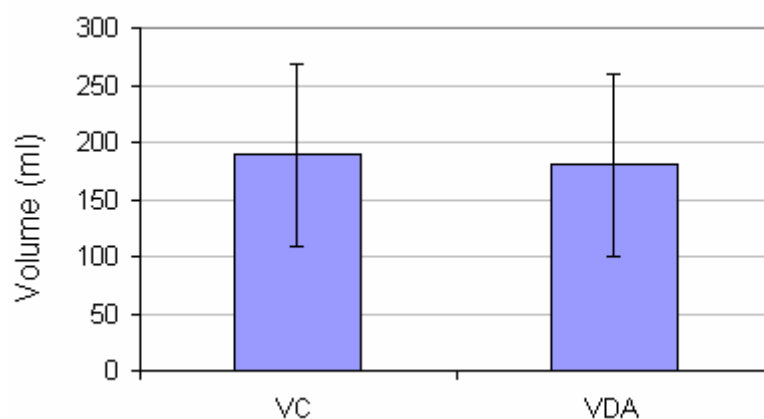


FIGURA 9 – COMPARAÇÃO ENTRE MÉDIAS DE VOLUME CALCULADO (VC) E O VOLUME MÉDIO OBTIDO PELO DESLOCAMENTO DE ÁGUA (VDA) (ml) DO TESTÍCULO DIREITO DE CARNEIROS SUFFOLK ( $n=12$ ). NÃO FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS VC E VDA ( $p > 0,05$ ). PINHAIS (PR).

Os valores médios de volume testicular calculado e mensurado obtidos durante o inverno ( $n=6$ ) e no verão ( $n=6$ ) para os reprodutores estão demonstrados na TABELA 2.

TABELA 2 – MÉDIA E DESVIO-PADRÃO DO VOLUME TESTICULAR CALCULADO (Vc) ATRAVÉS DE FORMULA MATEMÁTICA E MENSURADO ATRAVÉS DE DESLOCAMENTO DE ÁGUA (Vm) DE REPRODUTORES SUFFOLK ( $n=12$ ) NO INVERNO DE 2005 E NO VERÃO DE 2006, SOB CONDIÇÕES NATURAIS DE FOTOPERÍODO. PINHAIS - PR.

| Estação do ano  | Vc (ml)                     | Vm (ml)                     |
|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Inverno (Julho) | 123,15 ± 32,51              | 109,17 ± 26,07              |
| Verão (Março)   | 254,65 ± 39,04              | 251,83 ± 42,45              |
| Média total     | 188.90 <sup>a</sup> ± 74.92 | 180.50 <sup>a</sup> ± 79.55 |

Nota: letras iguais indicam que não houve diferença significativa ( $p = 0.1788$ ).

### 4.3 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE TESTOSTERONA

Os níveis de testosterona sérica variaram durante os 12 meses de estudo nos dois grupos estudados. Na TABELA 3 estão apresentados os resultados das concentrações médias de testosterona em cada mês de avaliação.

Foi observado um sincronismo no momento de aparecimento do pico máximo e mínimo de testosterona entre os grupos de cS e rS. Nos meses de julho e fevereiro foram obtidas as menores e as maiores médias, respectivamente, nos níveis de testosterona tanto para o grupo cS quanto para o grupo rS. No pico máximo, ocorrido em fevereiro, o valor médio de testosterona foi 14,6 vezes e 5,4 vezes maior do que na média mínima nos grupo cS e rS respectivamente (TABELA 3). O pico máximo de testosterona ocorreu aproximadamente dois meses após o solstício de verão e aproximadamente um mês antes da ocorrência da maior média de circunferência escrotal nos dois grupos de machos adultos. O valor médio mínimo de testosterona ocorreu aproximadamente um mês após o solstício de inverno e coincidiu com o momento de menor média de CE para os grupos cS e rS.

TABELA 3 - MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DE TESTOSTERONA (nM/l) DE CARNEIROS SUFFOLK (cS) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) E REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (n=3) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

|       | TESTOSTERONA         |                     |
|-------|----------------------|---------------------|
|       | cS                   | rS                  |
| ABR   | 2,66 ± 1,30          | 3,04 ± 2,63         |
| MAIO  | 1,21 ± 0,41          | 2,26 ± 2,12         |
| JUN   | 1,29 ± 1,38          | 0,93 ± 0,45         |
| JUL   | <b>0,95 ± 0,58*</b>  | <b>0,79 ± 0,14*</b> |
| AGO   | 1,47 ± 0,91          | 1,06 ± 0,59         |
| SET   | 1,89 ± 0,88          | 1,51 ± 0,77         |
| OUT   | 3,16 ± 1,40          | 0,93 ± 0,40         |
| NOV   | 6,10 ± 4,84          | 2,49 ± 0,45         |
| DEZ   | 7,43 ± 5,00          | 1,81 ± 0,16         |
| JAN   | 5,00 ± 1,18          | 1,88 ± 0,65         |
| FEV   | <b>13,87 ± 6,97*</b> | <b>4,29 ± 2,33*</b> |
| MAR   | 5,06 ± 3,77          | 3,05 ± 1,48         |
| MÉDIA | 4,18                 | 2,00                |

NOTA: \* houve diferença significativa (ANOVA) entre os meses para o cS ( $p < 0,001$ ) rS ( $p < 0,05$ )

A FIGURA 10 representa as oscilações de CE e de testosterona nas estações do ano para os grupos cS e rS. Foi possível verificar sincronismo no aumento e diminuição de valores médios de CE, acompanhado pelas variações médias das concentrações de testosterona em cada uma das estações do ano nos dois grupos. Houve correlação entre CE e os níveis séricos de testosterona no decorrer do ano no grupo cS ( $\rho = 0,6518$ ;  $p < 0,001$ ) e no grupo rS ( $\rho = 0,6092$ ;  $p < 0,01$ ).

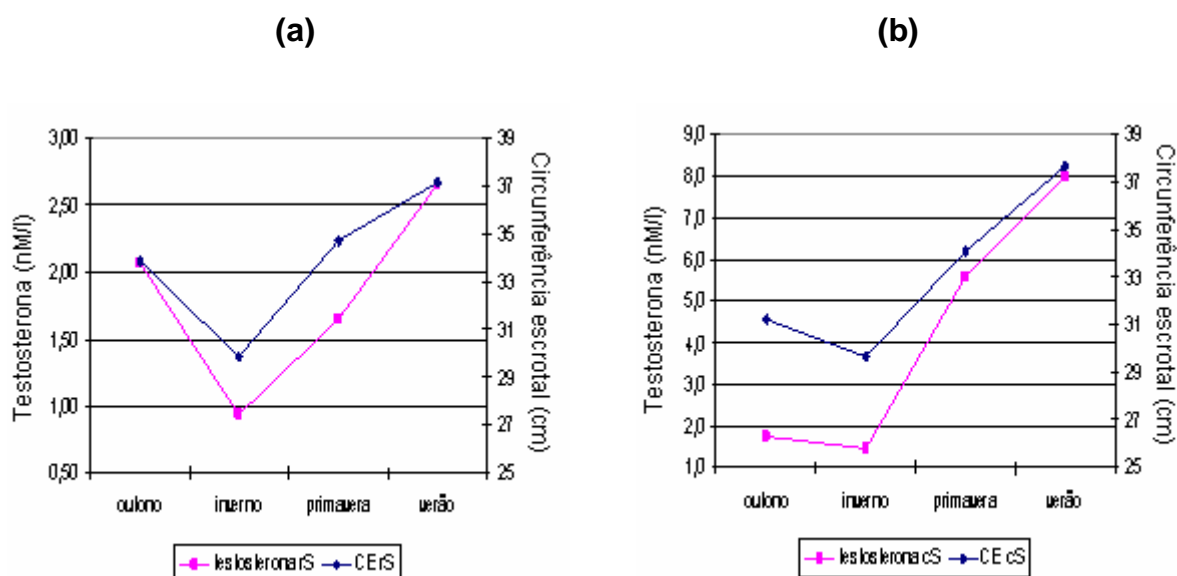


FIGURA 10 – VARIAÇÕES NOS NÍVEIS DE TESTOSTERONA (nM/l) E CIRCUNCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE) EM REPRODUTORES SUFFOLK (rS) (a) (n=3) E CARNEIROS SUFFOLK (Cs) (b) (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. HOVE CORRELAÇÃO SIGNIFICATIVA NO GRUPO CS ( $p < 0,001$ ) E NO GRUPO RS ( $p < 0,01$ ). PINHAIS (PR).

#### 4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DO SÊMEN

As avaliações realizadas quinzenalmente com o sêmen recém-colhido de cada carneiro do grupo cS foram tabuladas em valores médios mensais e comparadas com as variações médias da CE para o mesmo grupo (TABELA 4). Não foram observadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) nas variáveis: motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento entre os meses do ano.

As médias do volume do ejaculado, a concentração espermática e o número total de espermatozoides por ejaculado variaram significativamente ( $p < 0,001$ )

conforme o mês (TABELA 5). O volume médio do ejaculado, a concentração espermática média e, conseqüentemente, o número de espermatozóides por ejaculado apresentaram os menores valores em julho, coincidindo com a data de menor CE. O volume do ejaculado também aumentou quando se verificou a maior CE, porém a concentração espermática manifestou seu pico entre os meses de outubro a dezembro.

TABELA 4 - MÉDIAS E DESVIO PADRÃO MENSIS DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (CE), MOTILIDADE PROGRESSIVA (MP), VIGOR (V) E TURBILHONAMENTO (T) DO SÊMEN DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR)

|      | CE<br>(cm)   | MP<br>(0 - 100%) | V<br>(0 - 5) | T<br>(0 - 5) |
|------|--------------|------------------|--------------|--------------|
| ABR  | 32,35        | 65,55 ± 4,64     | 3,36 ± 0,49  | 2,92 ± 0,50  |
| MAIO | 31,88        | 76,67 ± 5,00     | 3,44 ± 0,53  | 3,44 ± 0,68  |
| JUN  | 29,34        | 65,83 ± 7,02     | 3,06 ± 0,28  | 2,94 ± 0,65  |
| JUL  | <b>27,63</b> | 69,58 ± 8,91     | 3,10 ± 0,54  | 2,75 ± 1,07  |
| AGO  | 29,29        | 62,00 ± 14,83    | 3,17 ± 0,75  | 2,83 ± 0,41  |
| SET  | 32,00        | 72,50 ± 7,58     | 3,21 ± 0,53  | 3,17 ± 0,47  |
| OUT  | 33,00        | 68,33 ± 16,02    | 3,25 ± 0,88  | 3,33 ± 1,63  |
| NOV  | 34,35        | 72,50 ± 7,58     | 3,25 ± 0,27  | 3,33 ± 0,89  |
| DEZ  | 34,96        | 68,33 ± 5,16     | 3,46 ± 0,51  | 3,21 ± 0,56  |
| JAN  | 37,25        | 68,33 ± 8,16     | 3,33 ± 0,54  | 2,88 ± 0,67  |
| FEV  | 37,42        | 75,00 ± 3,16     | 3,46 ± 0,51  | 3,25 ± 0,52  |
| MAR  | <b>38,17</b> | 75,83 ± 6,65     | 3,33 ± 0,44  | 3,42 ± 0,56  |

NOTA: Não houve diferença significativa (ANOVA) nos valores de MP, V e T entre os meses do ano ( $p > 0,05$ ). Para CE observou-se diferença significativa (ANOVA) entre os meses ( $p < 0,001$ )

Na FIGURA 11 é possível observar que as variações do volume médio do ejaculado apresentaram um grande sincronismo com as variações de CE ao longo do ano, compara-se também a relação do volume do ejaculado com o fotoperíodo. Houve correlação significativa entre CE e volume do ejaculado ( $\rho = 0,86865$ ;  $p < 0,001$ ). No momento em que ocorreram as menores médias de CE, também foram verificados os menores volumes de ejaculado. Os picos ocorreram no mês de março e os menores valores em julho.

TABELA 5 - VALORES MÉDIOS MENSAIS DE CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL, VOLUME DO EJACULADO, CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA E NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR)

|      | CE<br>(cm)   | Volume (ml) | Concentração<br>(x 10 <sup>6</sup> / ml) | N sptz/<br>ejaculado (X 10 <sup>6</sup> ) |
|------|--------------|-------------|--|---|
| ABR  | 32,35        | 1,07        | 1938                                     | 1781                                      |
| MAIO | 31,88        | 1,24        | 2978                                     | 3427                                      |
| JUN  | 29,34        | 0,91        | 2584                                     | 3380                                      |
| JUL  | <b>27,63</b> | <b>0,73</b> | <b>1855</b>                              | <b>1354</b>                               |
| AGO  | 29,29        | 0,82        | 3018                                     | 2279                                      |
| SET  | 32,00        | 0,95        | 2235                                     | 2190                                      |
| OUT  | 33,00        | 1,00        | 3703                                     | 3117                                      |
| NOV  | 34,35        | 1,24        | 3619                                     | 4608                                      |
| DEZ  | 34,96        | 1,26        | 3650                                     | 4831                                      |
| JAN  | 37,25        | 1,19        | 2460                                     | 3283                                      |
| FEV  | 37,42        | 1,36        | 2526                                     | 3431                                      |
| MAR  | 38,17        | 1,34        | 2589                                     | 3492                                      |

NOTA: houve diferença significativa (ANOVA) entre os meses para a variável volume ( $p < 0,001$ ) e para as variáveis concentração e n sptz/ejaculado ( $p < 0,01$ ).  
Sptz = espermatozoíde

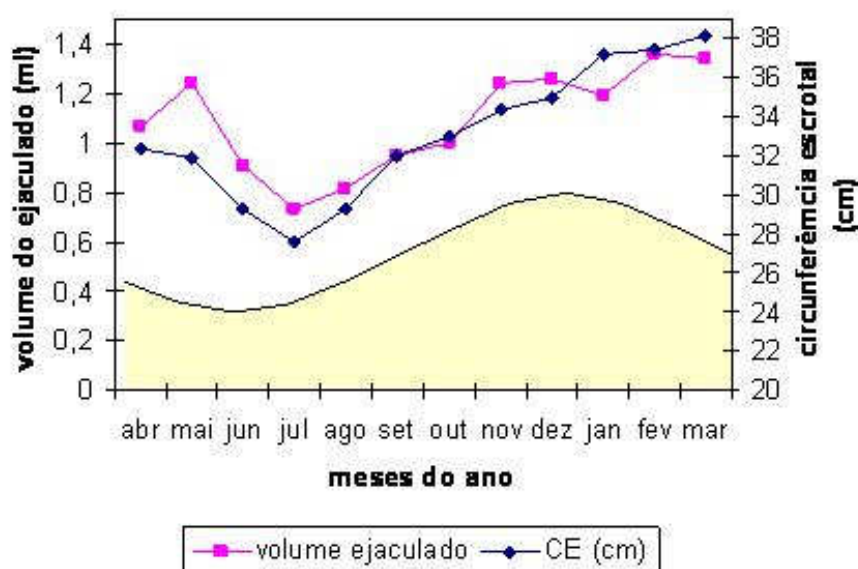


FIGURA 11 - VARIAÇÕES MÉDIAS DO VOLUME DO EJACULADO E CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. FOTOFASE REPRESENTADA EM AMARELO. HOUVE CORRELAÇÃO ENTRE VOLUME E CE ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR).

Ao se confrontar as características avaliadas no sêmen durante os 12 meses de mensurações foi possível verificar que houve uma correlação positiva entre concentração espermática e volume do ejaculado, entre concentração espermática e turbilhonamento e também entre concentração espermática e motilidade progressiva conforme demonstrado na TABELA 6.

TABELA 6 – COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO ( $\rho$ ) SEGUNDO MÉTODO DE SPEARMAN ENTRE VOLUME DO EJACULADO, MOTILIDADE PROGRESSIVA, VIGOR, TURBILHONAMENTO DO EJACULADO CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) AVALIADOS MENSALMENTE E SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

|                          | <b>Volume ejaculado</b> | <b>Motilidade</b> | <b>Vigor</b> | <b>Turbilhonamento</b> |
|--------------------------|-------------------------|-------------------|--------------|------------------------|
| Concentração espermática | 0.3244114***            | n.s.              | n.s.         | 0.4730431***           |
| Motilidade               | n.s.                    | --                | n.s.         | 0.4527398**            |

NOTA: n.s.= não significativo; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$

#### 4.5 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Na TABELA 7 foram compiladas as porcentagens médias mensais de alterações morfológicas das amostras de sêmen colhidas quinzenalmente. As maiores porcentagens de defeitos totais ocorreram nos meses de junho, julho, agosto, setembro e fevereiro, porém essas diferenças não foram estatisticamente significativas nas porcentagens de defeitos maiores ( $p = 0,07$ ), defeitos menores ( $p = 0,69$ ) ou total de defeitos ( $p = 0,69$ ) entre os meses estudados.

TABELA 7 - PORCENTAGEM MÉDIA DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPERMÁTICAS EM AMOSTRAS DE SÊMEN DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

|                  | ABR   | MAI  | JUN   | JUL   | AGO   | SET   | OUT  | NOV  | DEZ  | JAN  | FEV   | MAR  |
|------------------|-------|------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|
| defeitos maiores | 5,13  | 3,25 | 5,00  | 4,92  | 4,92  | 4,55  | 4,00 | 2,71 | 3,18 | 3,45 | 4,35  | 3,33 |
| defeitos menores | 5,24  | 6,05 | 7,48  | 7,81  | 7,50  | 8,64  | 5,42 | 4,79 | 5,18 | 5,50 | 9,60  | 4,29 |
| TOTAL            | 10,37 | 9,30 | 12,48 | 12,72 | 12,42 | 13,18 | 9,42 | 7,50 | 8,36 | 8,95 | 13,95 | 7,63 |

NOTA = não houve diferença significativa (ANOVA) ( $p > 0,05$ )

#### 4.6 ANÁLISE HISTOLÓGICA

A maioria das variáveis estudadas na análise histológica dos testículos obtidos na época de maior e de menor circunferência escrotal dos carneiros submetidos ao fotoperíodo natural apresentou diferenças significativas (TABELA 8).

Os diâmetros dos túbulos seminíferos variaram significativamente, sendo em média 1,32 vezes maiores no final do verão, quando ocorreu a maior CE, em relação ao período de menor CE que ocorreu no inverno. Para um crescimento médio de 30,71% na CE no verão houve um aumento médio correspondente de 32,03% no diâmetro dos túbulos seminíferos e 37,76% na espessura média das camadas celulares dos túbulos.

O aspecto do corte histológico (aumento de 100X) dos testículos colhidos na época de maior CE (março) e de menor CE (julho) está apresentado na FIGURA 12. É possível visualizar a diferença de tamanho de diâmetros dos túbulos e da espessura de camadas celulares entre as duas épocas e também a maior quantidade de túbulos considerando-se a mesma área quando ocorreu uma diminuição do diâmetro tubular (FIGURA 12b).

TABELA 8 – MÉDIAS E DESVIO PADRÃO DO DIÂMETRO, ESPESSURA E NÚMERO DE CAMADAS CELULARES DE TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CARNEIROS SUFFOLK NO MOMENTO DE MAIOR (n= 6) E MENOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (n= 6) CONFORME VARIAÇÃO REPRODUTIVA SAZONAL EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

|                | <b>CE<br/>(cm)</b> | <b>Diâmetro túbulo<br/>(<math>\mu</math>m)</b> | <b>Espessura camadas<br/>celulares (<math>\mu</math>m)</b> | <b>Nº camadas</b>            |
|----------------|--------------------|--|--|------------------------------|
| Inverno        | 27,41 <sup>a</sup> | 180,46 $\pm$ 26,84 <sup>a</sup>                | 47,59 $\pm$ 15,46 <sup>a</sup>                             | 4,42 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> |
| final do verão | 35,83 <sup>b</sup> | 238,27 $\pm$ 24,91 <sup>b</sup>                | 65,56 $\pm$ 13,30 <sup>b</sup>                             | 5,95 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup> |

NOTA: letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,001$ )

Através da contagem das diferentes células da linhagem germinativa e também das células de Sertoli, verificou-se a presença de um número significativamente maior de espermatogônias, espermatócitos, espermátide redonda e espermátide alongada/espermatozóide ( $p < 0,001$ ) nos túbulos seminíferos com maior diâmetro, fato ocorrido no final do verão. O número de células de Sertoli não apresentou diferença significativa entre as duas estações do ano ( $p = 0,1920$ ) (FIGURA 13).



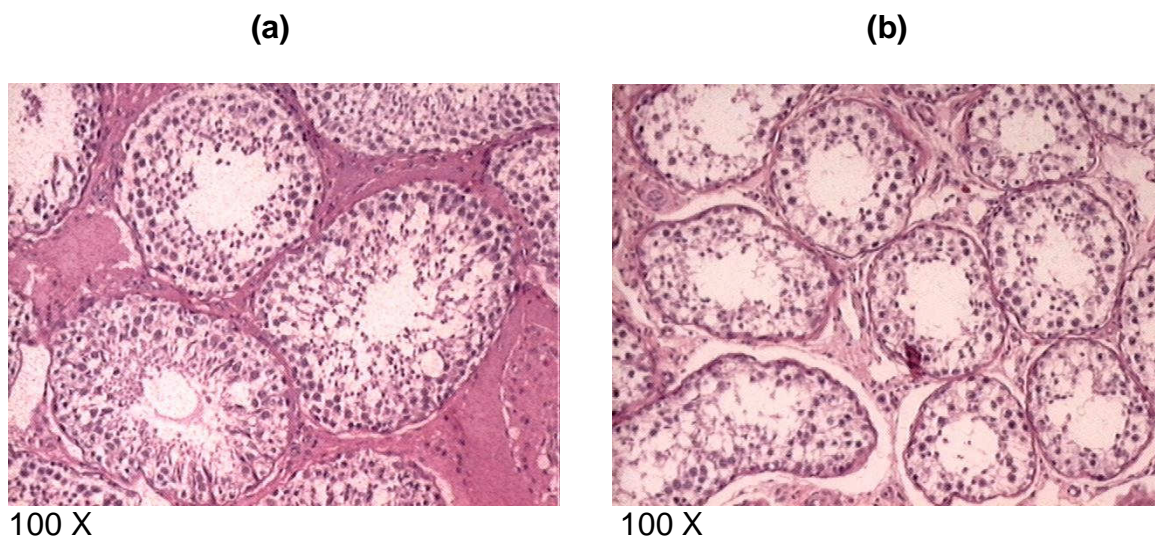


FIGURA 12 – DIFERENÇAS HISTOLÓGICAS ATRIBUÍDAS AO FOTOPERÍODO EM MOMENTO DE MAIOR (FINAL DE VERÃO) (a) E MENOR (INVERNO) CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL(b) EM TÚBULOS SEMINÍFEROS DE CARNEIROS SUFFOLK EM LATITUDE 25°25'40"S. PINHAIS (PR).

No momento de maior CE observou-se que o número médio de espermatogônias aumentou em 46,5%, assim como houve 55% de aumento no número de espermatócitos. Porém, as espermátides alongadas/espermatozóides e as espermátides redondas foram as células que apresentaram a maior diferença numérica entre testículos na época de maior e menor CE, verão e inverno, respectivamente. O número de espermátides alongadas / espermatozóides e de espermátides redondas foi 4,82 e 2,36 vezes maior no verão em relação ao inverno.

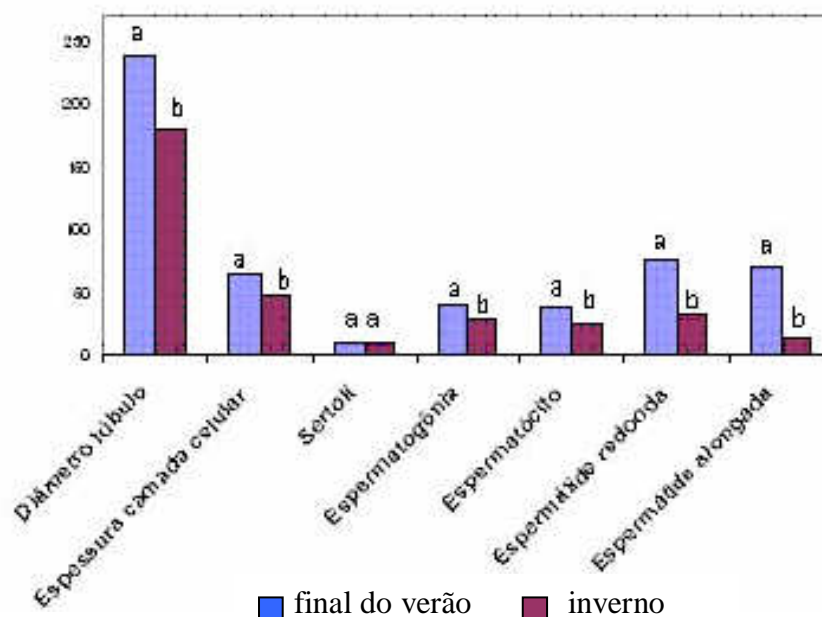


FIGURA 13 - NÚMERO TOTAL MÉDIO POR TÚBULO SEMINÍFERO DAS DIVERSAS CÉLULAS DA LINHAGEM GERMINATIVA E CÉLULAS SERTOLI EM TESTÍCULOS DE OVINOS SUFFOLK SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S OBTIDOS NA ÉPOCA DE MAIOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (FINAL DO VERÃO, n=6) E DE MENOR CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (INVERNO, n=6). LETRAS DIFERENTES ENTRE COLUNAS QUE COMPARAM CADA CARACTERÍSTICA INDICAM DIFERENÇA ESTATÍSTICA ( $p < 0,001$ ). PINHAIS (PR).

#### 4.7 APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DAS VARIAÇÕES REPRODUTIVAS SAZONAIS

As alterações sazonais significativas das qualidades físicas do sêmen levaram a variações importantes na estimativa do número médio de doses de sêmen obtidas, durante cada mês do ano. Levando em consideração o volume do ejaculado e concentração espermática, foi possível obter o número de espermatozóides por ejaculado. Na FIGURA 14, observa-se a variação mensal do número de espermatozóides por ejaculado dos seis carneiros que permaneceram no experimento durante os 12 meses. Para efeito de simulação foi comparada a média de um dos animais (carneiro 806) em relação à média dos demais do grupo. Esta característica variou significativamente ( $p = 0.0133$ ) conforme o mês do ano. Os

valores maiores e menores foram obtidos em dezembro e em julho, respectivamente.

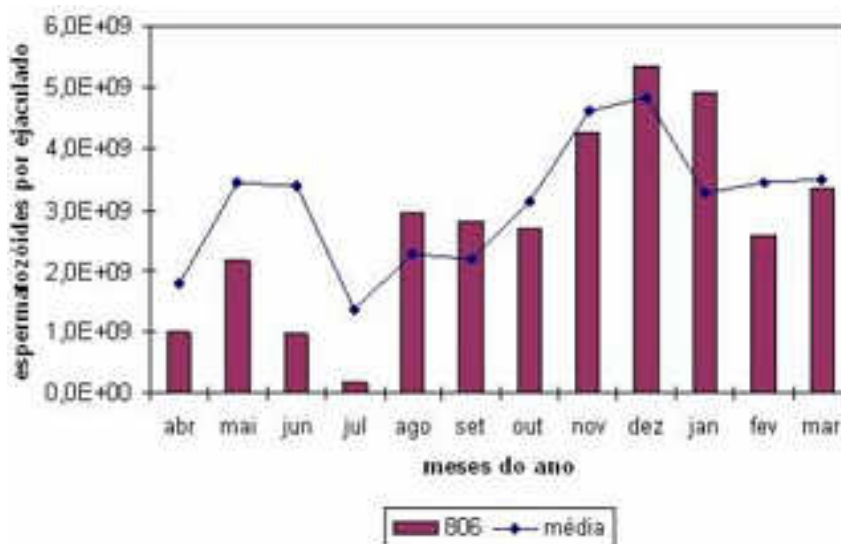


FIGURA 14 – MÉDIA DAS VARIAÇÕES MENSAIS DO NÚMERO DE ESPERMATOZÓIDES POR EJACULADO DE CARNEIROS SUFFOLK ( $n=12$  DE ABRIL A AGOSTO E  $n=6$  DE SETEMBRO A MARÇO) COMPARADOS A UM CARNEIRO DO GRUPO (806), TODOS SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S. FORAM OBSERVADAS DIFERENÇAS SIGNIFICATIVAS ENTRE OS MESES ( $p = 0,0133$ ). PINHAIS (PR).

O número calculado de doses de sêmen congelado variou em função do número de espermatozoides por ejaculado e verificou-se o mínimo de produção ou ausência de produção nos meses de junho/julho considerando a média dos seis carneiros ou apenas um carneiro (TABELA 9). A produção máxima estimada ocorreu em dezembro totalizando até 2120 doses no mês. Foi possível observar que nos dois meses de baixa produção espermática, considerando o grupo experimental ou somente um carneiro, o ejaculado apresentou concentração inadequada para diluição e produção de doses com 0,25 ml contendo 100 milhões de espermatozoides. Nestas condições, considerou-se ausência de produção de sêmen congelado naquele mês.

TABELA 9 – ESTIMATIVA DA VARIAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE DOSES DE SÊMEN OVINO CONGELADO OBTIDO EM CADA MÊS DE CARNEIROS SUFFOLK (n=12 DE ABRIL A AGOSTO E n=6 DE SETEMBRO A MARÇO) SOB INFLUÊNCIA DE FOTOPERÍODO NATURAL EM LATITUDE 25°25'40"S COMPARADOS AOS VALORES OBTIDOS POR UM CARNEIRO DO GRUPO. PINHAIS (PR).

| MÊS  | Nº MÉDIO SPTZ/EJACULADO (10 <sup>6</sup> ) |       | VOLUME MÉDIO DO EJACULADO (ml) |       | QUANT. DE DILUENTE (ml) |        | Nº DOSES/EJACULADO |       | Nº DOSES/MÊS |             |
|------|--|-------|--------------------------------|-------|-------------------------|--------|--------------------|-------|--------------|-------------|
|      | C806                                       | Média | C806                           | Média | C806                    | Média  | 806                | Média | C806         | Média       |
| ABR  | 993  | 1781  | 0,75                           | 0,96  | 1,75                    | 3,29   | 10                 | 17    | 400          | 680         |
| MAIO | 2167                                       | 3427  | 1,00                           | 1,15  | 4,25                    | 7,35   | 21                 | 34    | 840          | 1360        |
| JUN  | 954  | 3380  | 1,00                           | 1,02  | 1,25                    | -0,27* | 9                  | -     | <b>360</b>   | -           |
| JUL  | 159  | 1354  | 0,40                           | 0,67  | 0,15*                   | 2,58   | -                  | 13    | -            | <b>520</b>  |
| AGO  | 2950                                       | 2279  | 1,30                           | 0,82  | 5,95                    | 4,68   | 29                 | 22    | 1160         | 880         |
| SET  | 2805                                       | 2190  | 1,25                           | 0,95  | 5,75                    | 4,55   | 28                 | 22    | 1120         | 880         |
| OUT  | 2691                                       | 3117  | 1,00                           | 1,00  | 5,75                    | 6,75   | 27                 | 31    | 1080         | 1240        |
| NOV  | 4271                                       | 4608  | 1,35                           | 1,24  | 9,15                    | 10,26  | 42                 | 46    | 1680         | 1840        |
| DEZ  | 5356                                       | 4831  | 2,30                           | 1,44  | 10,95                   | 10,56  | 53                 | 48    | <b>2120</b>  | <b>1920</b> |
| JAN  | 4909                                       | 3283  | 1,55                           | 1,19  | 10,7                    | 6,81   | 49                 | 32    | 1960         | 1280        |
| FEV  | 2595                                       | 3431  | 1,25                           | 1,36  | 5,25                    | 7,14   | 26                 | 34    | 1040         | 1360        |
| MAR  | 3357                                       | 3492  | 1,30                           | 1,34  | 6,95                    | 7,41   | 33                 | 35    | 1320         | 1400        |

NOTA: C806 = código do animal utilizado como modelo

\* volume do sêmen diluído é menor que o volume do ejaculado

dose de sêmen = mínimo de 100 milhões de espermatozóides em palheta de 0,25ml

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho corresponde ao primeiro resultado científico sobre a estacionalidade reprodutiva de reprodutores da raça Suffolk em ambiente que apresenta menor diferença no fotoperíodo em relação ao local de origem da raça. Desenvolvem-se a seguir as considerações teóricas e práticas correlacionadas às hipóteses aqui elaboradas.

Uma das premissas para o desempenho pleno das condições reprodutivas nos animais domésticos é a apresentação de condições de saúde adequadas. Segundo BRUERE (1986) afecções sistêmicas moderadas ou graves e as afecções do aparelho reprodutivo afetam indireta ou diretamente a fertilidade de machos ovinos. Durante o período experimental não foi verificada presença de sinais de doença nos animais, portanto, frente aos resultados obtidos, trabalhou-se com a hipótese de não interferência de condições sanitárias sobre as características reprodutivas avaliadas.

Outro fator importante no desempenho reprodutivo é a alimentação (OLDHAM *et al.*, 1978) e conseqüentemente a condição corporal que apresentam. Carneiros com escores corporais baixos apresentam diminuição da fertilidade quando comparados a animais com escores médios. Porém, também se observa o contrário. FOURIE *et al.* (2004) verificaram que a obesidade pode levar ao acúmulo de gordura na região do cordão espermático e interferir na termorregulação testicular e conseqüentemente na fertilidade. No presente trabalho a condição corporal dos carneiros oscilou entre 3 e 4 ao longo do experimento. Tomou-se o cuidado de fornecer alimentação de qualidade e em quantidade compatível com a necessidade fisiológica dos animais segundo o NRC (1985) para que não houvesse oscilação entre incremento e redução nutricional que resultassem em condições corporais inadequadas, fator que poderia interferir nas características reprodutivas avaliadas. Assim, também foi descartada a possibilidade de interferência nutricional nos resultados observados.

A medida da CE é muito utilizada como parâmetro de avaliação andrológica e também de seleção genética em ruminantes. Pesquisadores preocuparam-se em verificar a relação existente entre a CE e a massa corporal de reprodutores ovinos (OLDHAM *et al.*, 1978; FERREIRA *et al.*, 1988; HOTZEL *et al.*, 2003). Na tentativa de inferir uma medida futura a partir de avaliações de CE em animais jovens,

FERREIRA *et al.* (1988) trabalhando com carneiros Corriedale de oito meses de idade no Brasil, verificaram que a CE está em função linear do peso desde que a época do ano não seja levada em consideração ou o crescimento do animal. Na prática, no trabalho supracitado, a análise de regressão permitiu inferir que se um carneiro Corriedale pesasse de 47 Kg a CE variaria entre 24,5 a 27,5 cm, mas no verão este valor estaria compreendido entre 30 a 32 cm. No presente trabalho observou-se um aumento constante e crescente da massa corporal durante o ano em que o experimento foi realizado, quer seja no grupo de carneiros de um quanto de três anos de idade. Quando não se considerou o efeito do tempo não houve correlação direta entre peso total e CE para os dois grupos (FIGURA 7 e 8) . Estes resultados diferem de BRAUN *et al.* (1980) que observaram esta correlação em algumas raças ovinas estudadas em Missouri e concluíram que carneiros mais pesados apresentavam tendência de ter maior CE. Por outro lado, YARNEY *et al.* (1990) mostraram que o diâmetro testicular de carneiros da raça Suffolk aos 6-7 meses não foi maior do que aos 13-14 meses de idade, apesar do incremento de 60% no peso vivo entre estas idades. KAFI *et al.* (2004) também não verificaram correlação entre peso corporal e CE em carneiros Karakul ( $n = 6$ ) em latitude 29°N. MICKELSEN *et al.* (1981) concluíram que a circunferência escrotal não variou conforme o peso corporal nos animais estudados, já a estação do ano e a raça tiveram mais efeito na circunferência escrotal do que o aumento do peso corporal. No presente trabalho, um forte indício de que o aumento de peso não interferiu na medida de CE foi que no grupo de reprodutores de três anos (rS) a média de massa corporal no início do experimento (abril 2005) foi de 98,00 Kg com medida de CE de 34,5 cm e doze meses depois a massa foi de 121,6 Kg e a medida de CE foi de 34,75 cm. Ou seja, houve aumento de 23,6 Kg de massa para apenas 0,25 cm de aumento de CE o que corrobora a hipótese de que o peso corporal nos animais estudados não interfere na circunferência escrotal (ANEXO 4 e 6) .

Ao considerar os resultados ao longo dos meses do ano, verificou-se correlação positiva entre o aumento da massa corporal e o aumento da medida de CE em alguns meses específicos (julho/agosto até março) para os dois grupos estudados. Nestes meses houve crescimento testicular e também, aumento de massa corporal, ressaltando que o aumento da massa foi progressivo e crescente em todos os meses do ano. Durante os meses de abril a julho, enquanto houve o aumento da massa corporal ocorreu diminuição do tamanho testicular. Ao considerar

somente o declínio do tamanho testicular (grupo cS), que ocorreu a partir de abril até julho, a redução da CE foi de 5,17 cm o que corresponde a uma diminuição de 15,80% apesar do aumento médio de 15,9% na massa corporal do grupo no mesmo período (FIGURA 6 e 7). Este fato levanta a hipótese que, nesta época, houve outros fatores envolvidos na regressão testicular e que teriam tido maior dominância. HOTZEL *et al.* (2003) observaram que a resposta do sistema reprodutivo de carneiros a uma estimulação nutricional (incremento da dieta) pode ser influenciada pela época do ano. A influência sazonal ocorre apenas em raças que respondem fortemente ao fotoperíodo, ou seja, o incremento nutricional em épocas de anestro sazonal das ovelhas desta raça não modifica a resposta reprodutiva no macho, mas o fazem durante as estações reprodutivas. GASTEL *et al.* (1995) ao trabalharem com a raça Corriedale (n=35) na latitude de 32°S verificaram um aumento da CE no verão e diminuição nesta medida no inverno. Os autores inferiram este resultado ao efeito acumulativo de fotoperíodo e nutrição, já que durante o inverno há escassez de forragem e nesta época não houve ganho de peso, além de ter ocorrido diminuição da CE. Mas no verão verificou-se ganho de peso e aumento de CE. Ao comparar estes resultados aos obtidos no presente trabalho verifica-se coincidência nas épocas de maior e de menor CE nos dois experimentos, apesar de serem raças e dietas diferentes, mas em latitudes semelhantes (29° e 32°S). No presente estudo, trabalhou-se com a hipótese nula para a alimentação, já que ela foi constante ao longo do ano. O decréscimo do tamanho testicular ocorreu no inverno, mesmo quando os animais continuavam a ganhar peso (FIGURA 6 e 7). Corroborando os resultados de HOTZEL *et al.* (2003) na raça Suffolk verifica-se que o fotoperíodo é mais forte que a nutrição nas oscilações do tamanho testicular durante as estações do ano. Mesmo mantendo dieta padronizada esta não foi capaz de impedir a diminuição testicular no inverno nos carneiros estudados.

A atribuição do fotoperíodo nas oscilações de CE é corroborada pela correlação positiva entre tamanho da CE e fotofase e descarte da interferência de fatores nutricionais e saúde (FIGURA 5). A redução significativa da CE, em uma época do ano, é um dos mecanismos de estratégia reprodutiva que envolve métodos contraceptivos naturais para assegurar a maioria dos nascimentos quando as condições ambientais são mais favoráveis (LINCOLN e SHORT, 1980). Para sincronizar o período fértil os animais seguem pistas ambientais. Entre as diversas variações ambientais sazonais o fotoperíodo fornece uma pista mais segura já que

permanece constante de um ano para outro (GERLACH e AURICH, 2000). Segundo ROSA e BRYANT (2003) a sazonalidade reprodutiva em ovinos é gerada por um ritmo circanual endógeno de atividade neuroendócrina reprodutiva e a função do fotoperíodo não é criar este ritmo, mas sim sincronizá-lo. Levando em consideração estes fatores, EVANS e MAXWELL (1987) sugerem que, do ponto de vista reprodutivo, os ovinos são animais de “dias curtos” já que em altas latitudes tendem a concentrar a estação reprodutiva nos meses de outono quando os dias estão encurtando.

Foi possível observar neste experimento, realizado em baixa latitude, de maneira geral, que a variação na medida testicular foi correlacionada positivamente com a fotofase, ou seja, quando o número de horas de luz diminuiu ocorreu o mesmo com a CE e vice-versa (FIGURA 5). Houve, entre todos os animais, um grande sincronismo no momento e na magnitude das variações de CE, denotando homogeneidade de resposta à luminosidade durante um ciclo anual completo (ANEXO 4). O momento de menor CE (julho) ocorreu um mês após o dia mais curto do ano e a maior medida de CE foi encontrada três meses após o solstício de verão. Este período foi mais extenso do que o observado por COUROT e ORTAVANT (1981) que constataram o peso máximo testicular entre a oitava e décima semanas após o início das mudanças graduais de fotoperíodo decrescente. Os mesmos autores constataram que a atividade sexual máxima, em machos e fêmeas da mesma raça, ocorre aproximadamente na sexta e sétima semanas posteriores ao máximo tamanho testicular, podendo esperar o pico reprodutivo entre 14 a 17 semanas após a mudança de fotoperíodo.

No presente trabalho o intervalo entre picos (máximo e mínimo) não foi simetricamente distribuído, já que um pico ocorreu em julho e o outro em março para os dois grupos estudados (ANEXO 3 e FIGURA 5). Para involução testicular foram necessários três meses e para atingir o pico máximo, oito meses. Nem sempre picos simétricos são observados. É interessante observar que, no hemisfério norte, o pico mínimo de CE foi observado na primavera (HOCHEREAU DE REVIERS *et al.*, 1976; DICKSON e SANFORD, 2005). Diferentemente destes resultados, no presente trabalho, a CE foi menor no inverno corroborando dados de GARCIA-DERAGON *et al.*, (1985) e GASTEL *et al.*, (1995) para o hemisfério sul. Ressalta-se ainda que MICKELSEN *et al.* (1982) e KAFI *et al.*, (2004), trabalhando no hemisfério norte, encontraram menores valores de CE no inverno.



No verão foram observadas as maiores médias de CE (ANEXO 3 e FIGURA 5). Estes dados concordam com os de GASTEL *et al.* (1995) e discordam de KAFI *et al.* (2004) e DICKSON e SANFORD (2005) que encontraram maiores valores no outono. Observa-se que quando se considera a espécie ovina não se pode considerar uma estação do ano fixa para a ocorrência dos menores e maiores valores de CE, já que são observadas diferenças entre as raças e latitudes aonde são criadas. Porém, os resultados deste trabalho concordam com a afirmação de PELLETIER e ALMEIDA (1987) os quais sugerem que há uma forte tendência de todos os parâmetros reprodutivos apresentarem-se baixos no inverno e primavera e altos no verão e outono.

Durante o transcurso do presente experimento observou-se que as maiores e menores médias de CE foram de aproximadamente 37,6 e 27,6 cm no grupo cS e 41,0 a 29,7 cm no grupo Rs (ANEXO 3), implicando em uma diferença aproximada de 11 cm entre o pico de crescimento ocorrido em março (verão) e o pico de regressão ocorrido em julho (inverno). Esta diferença foi acentuada comparando-se a outros estudos. Porém, diferentes metodologias podem ser utilizadas para a avaliação da CE entre diversos autores. Medidas de CE podem ser feitas pressionando (MARTIN *et al.* 2002) ou não pressionando os testículos para baixo (FONSECA *et al.*, 1992) o que pode representar uma pequena discordância no valor total obtido entre os diferentes autores. GASTEL *et al.* (1995) com a raça Corriedale constataram medidas de 31 cm no pico máximo e 26,5 cm na época de involução testicular. Na raça Suffolk (n=4) DICKSON e SANFORD (2005) observaram em latitude 50°N que o pico de circunferência escrotal ocorreu no mês de setembro (outono) com uma média de 36,1cm e os valores mínimos (30 cm) ocorreram em março (primavera). HOTZEL *et al.* (2003) trabalhando carneiros Suffolk em manutenção observaram variações médias de 29,8 cm a 34,5 cm de CE na latitude 31°S (Austrália). MICKELSEN *et al.* (1982) obtiveram maiores medidas de CE em carneiros Suffolk (n=5) em agosto (verão - 38,1 cm) e menores em fevereiro (inverno - 32,6 cm) em animais criados nos Estados Unidos.

Comparando-se os resultados obtidos com os resultados de outros pesquisadores, nas latitudes 25° a 50°, é possível observar que a magnitude de variação do tamanho testicular não está intimamente correlacionada ao grau de latitude, mesmo quando se comparam carneiros da mesma raça. Esta resposta pode ser explicada pelo ritmo endógeno que regula da atividade reprodutiva sazonal.

Existem evidências de uma ritmicidade endógena porque animais submetidos a longos períodos de luz constante ou funcionalmente bloqueados para a transmissão de informações fotoperiódicas, continuam a expressar mudanças nas condições reprodutivas. Entretanto, sem nenhuma sincronia com os outros animais ou com o ciclo natural de reprodução (GERLACH e AURICH, 2000). Mas, mesmo pequenas variações sazonais são suficientes para sincronizar o ritmo endógeno (ROSA e BRYANT, 2003). Observa-se, também, que a atividade reprodutiva não é uma função direta do comprimento do dia, mas sim do resultado da história fotoperiódica do animal e da direção da mudança do fotoperíodo (ROBINSON e KARSCH, 1987).

Verificou-se, no presente experimento, que as medidas médias de CE começaram a declinar no final do mês de março, aproximadamente três meses antes do primeiro dia de solstício de inverno (FIGURA 5). O início do aumento da CE ocorreu a partir de julho/agosto, aproximadamente cinco meses antes do solstício de verão. Considerando que os solstícios são os momentos que marcam a alteração da direção de aumento ou diminuição da quantidade de luz por dia verificou-se uma antecipação do crescimento ou regressão da CE em relação aos solstícios. PELLETIER e ALMEIDA (1987) também observaram aumento do peso testicular antes do solstício de verão em carneiros Ile-de-France quando os dias ainda estão aumentando e, portanto, ainda não há estímulo para início das atividades reprodutivas. LANGFORD *et al.* (1999), ao submeterem carneiros a fotoperíodos artificiais, verificaram alterações hormonais e de CE após a mudança do número de horas de luz por dia. A exposição de carneiros a 16 horas de luz e 8 horas de escuridão causou regressão na CE após três meses de exposição, enquanto que a exposição a dias curtos (16 horas de escuridão) levou a recuperação do tamanho testicular em dois meses. Apesar das alterações artificiais de fotoperíodo serem capazes de induzir mudanças em níveis hormonais e na CE, sabe-se que diversos organismos, em situações naturais, antecipam eventos fisiológicos para otimizar o sucesso reprodutivo (LINCOLN *et al.*, 2003). A antecipação de características fisiológicas que melhoram o desempenho reprodutivo em relação ao fotoperíodo pode ser uma resposta reprodutiva mais intensa nos machos, os quais necessitam iniciar uma otimização dos processos reprodutivos antes do que as fêmeas. ROSA e BRYANT (2003) relatam que a sensibilidade dos carneiros ao número de horas de luz no dia é diferente das ovelhas, já que a atividade sexual do reprodutor é estimulada 30 a 45 dias antes em relação às ovelhas. A antecipação é importante

porque as ovelhas em anestro podem ovular poucos dias após um estímulo hormonal enquanto que os carneiros necessitam aproximadamente 45 dias para completar a espermatogênese. Para ROBINSON e KARSH (1987) os ovinos submetidos a longos períodos de luz relativamente fixos perdem a capacidade de resposta a aquele fotoperíodo e se tornam fotorrefratários. Os ovinos podem se tornar refratários para dias curtos ou longos quando permanecem com a mesma quantidade de luz por muito tempo. Baseados nestas informações MALPAUX *et al.* (1989) consideram que o início da estação de anestro nas ovelhas (final de inverno e primavera) não ocorre devido a chegada dos dias longos, mas sim porque elas se tornam insensíveis aos efeitos estimulatórios de dias curtos que estão ocorrendo há muito tempo. Da mesma forma, as ovelhas começam a ovular no verão/outono não porque foram expostas a dias curtos, mas sim porque não estão mais inibidas (estão refratárias) por dias longos. Os mesmos autores sugerem que em condições naturais os dias longos tem a capacidade de sincronizar o início da estação reprodutiva enquanto que os dias curtos têm a função de sustentá-la.

No presente trabalho, as medidas de largura e comprimento testiculares foram utilizadas para a obtenção do volume testicular através de cálculo indireto. Observou-se constante simetria, ao longo do experimento, das medidas obtidas do testículo direito e do esquerdo ao comparar o mesmo reprodutor. Isto denota comportamento idêntico dos dois testículos em relação aos efeitos da sazonalidade. Estes resultados corroboram os obtidos por BICUDO (1998) que também observou simetria testicular ao longo do ano em carneiros Ideal. O fato das medidas dos eixos testiculares serem iguais entre as duas gônadas permitiu que fosse utilizado somente um testículo para obter, no presente trabalho, o valor de massa testicular por deslocamento de água que foi comparado ao valor de volume testicular calculado. Os valores de volume testicular, diferentemente da medida de CE, fornecem uma medida tridimensional da gônada e podem ser muito úteis e até mais apurados que a medida de CE na escolha de (UNANIAN *et al.*, 2000). O volume testicular também é uma medida mais precisa na estimativa de produção diária de espermatozóides por reprodutor, pois representa melhor a quantidade de parênquima testicular (OLDHAM *et al.* 1978). Os valores de volume testicular também são mais fidedignos em relação à capacidade de produção de espermatozóides em animais ou raças que possuem testículo longo e fino, como é o

caso da raça Santa Inês, neste caso a medida de CE poderia subestimar o potencial reprodutivo destes animais (BAILEY *et al.*, 1996; MARTINS *et al.*, 2003).

Várias metodologias para mensuração de volume vêm sendo sugeridas (KNIGHT, 1977; OLDHAM *et al.*, 1978; AVDI *et al.*, 2004). Porém podem apresentar algumas desvantagens de praticidade ou na confiabilidade. No caso da imersão em água, do escroto e seu conteúdo *in vivo*, os valores obtidos incluem tecidos não testiculares como túnicas, escroto e epidídimos resultando em medidas superestimadas. As avaliações comparativas com o orquidômetro são mensurações subjetivas que podem variar conforme o avaliador e, ainda, com relação às medidas indiretas obtidas através de diferentes fórmulas matemáticas propostas (KNIGHT, 1977; OLDHAM *et al.* 1978; MARTINS *et al.* 2003) são verificadas variações importantes nos resultados obtidos ou nem sempre podem ser reproduzidas por outros pesquisadores.

No presente experimento foi possível obter o volume testicular através de medidas de largura e comprimento das gônadas utilizando-se fórmula matemática adaptada de GRANVILLE (1956). É importante lembrar que ao utilizar o cálculo, o valor referente à medida do escroto (neste experimento = 0,2 cm) deve ser diminuído dos valores de largura e comprimento para que o volume não seja superestimado. Verificou-se boa eficiência da metodologia padronizada por apresentar alta correlação ( $r = 0,97$ ,  $p < 0,05$ ) com os valores reais de volume médio obtido por deslocamento de água e por sua praticidade (FIGURA 9).

OLDHAM *et al.* (1978), ao comparar diferentes metodologias de cálculo de volume testicular, obtiveram melhores resultados de correlação entre o peso testicular e a utilização do orquidômetro ( $r = 0,96$ ). Quando os autores compararam o peso testicular com deslocamento de água medidas *in vivo* obtiveram  $r = 0,83$  e ao compararem esta medida com o valor testicular calculado através de medidas dos eixos testiculares observaram  $r = 0,86$ . Porém, estes autores utilizaram fórmula matemática diferente da sugerida no presente trabalho. AVDI *et al* (2004), utilizando orquidômetro nas raças Chios e Serres, em latitude 41°N, verificaram volumes médios anuais de um testículo de  $146 \pm 5,34$  e  $138 \pm 4,99$  ml, respectivamente. Em ambas as raças o volume testicular foi maior no final do verão e então decresceu até o começo do inverno, permanecendo baixo até o início da primavera para, novamente, voltar a aumentar em entre a metade da primavera e verão. DICKSON e SANGFORD (2005) trabalhando com quatro raças (Suffolk, Dorset, Finnish Landrace

e Scottish Blackface) no Canadá (latitude 50°N), com massa testicular calculada através de equação de regressão, verificaram que os testículos dos carneiros de todas as raças foram menores em maio (primavera). No trabalho acima citado, nos meses de setembro e outubro (outono), os carneiros Suffolk apresentaram na soma de ambos testículos a massa de  $411 \pm 5$  g e para as quatro raças combinadas a massa testicular regrediu  $127 \pm 8$  g o que representou uma diminuição de 33,2% entre a época de maior e de menor tamanho testicular. Esta porcentagem é inferior à obtida no presente experimento, já que foi observado, para um testículo, média de 123,15 ml no inverno, período de menor tamanho testicular (TABELA 2). No momento de maior crescimento verificou-se volume médio de 254,65 ml, portanto houve aumento de 131,5 ml (106,8%) entre os meses de menor e maior desenvolvimento gonadal. Estes valores são semelhantes aos obtidos por BICUDO (1998) que, apesar de trabalhar com carneiros Ideal (raça menos sazonal) em latitude menor (22°S), verificou volumes testiculares médios (um testículo) de aproximadamente  $185 \text{ cm}^3$  no inverno e de  $253 \text{ cm}^3$  no outono (abril). Esta diferença representou quase o dobro do volume no momento do maior em relação ao momento de menor tamanho testicular. MARTINS *et al.* (2003) observaram diminuição significativa do volume testicular nos meses de maio a agosto em carneiros Santa Inês ( $n = 5$ ), raça conhecida por apresentar baixa sazonalidade reprodutiva, na estação seca (maio a setembro). Porém, neste caso, os autores atribuíram este resultado a diminuição do aporte nutricional nestes meses. Contudo, nota-se coincidência no momento de diminuição de tamanho testicular com os encontrados no presente trabalho. Através destas observações percebe-se a necessidade de realização de novos estudos em latitudes baixas e com dieta padronizada ao longo do ano para uma análise acurada do efeito do fotoperíodo em raça conhecida por apresentar pouca sazonalidade reprodutiva.

Mudanças no tamanho testicular, causadas pelo fotoperíodo, podem ser relacionadas com alterações em níveis de hormônios relacionados à reprodução. Porém, a magnitude e o momento de ocorrência destas modificações são diferentes entre as raças ovinas (LINCOLN *et al.*, 1990). No presente experimento, foram observadas variações significativas das concentrações de testosterona durante os diferentes meses do ano e os níveis médios apresentaram correlação com a CE nas quatro estações do ano (TABELA 3). Estes resultados concordam com os obtidos por DICKSON e SANGFORD (2005) que também detectaram correlação significativa

entre níveis de testosterona com CE em várias raças ovinas estudadas. Resultados diferentes foram obtidos por GASTEL *et al.* (1995) que não verificaram correlação destas duas variáveis em carneiros Corriedale. Os autores propuseram que a ausência de correlação entre testosterona e CE pode ter ocorrido porque os animais avaliados ainda não estavam plenamente desenvolvidos, uma vez que em condições extensivas de criação os carneiros podem crescer até os três anos de idade. SANTIAGO-MORENO *et al.* (2005) obtiveram valores médios de testosterona correlacionados significativamente com as variações sazonais no tamanho testicular tanto em muflões quanto em carneiros Merino (latitude 40°N). Os picos máximos ocorreram no outono e os mínimos no inverno para muflões, já os picos máximos ocorreram antes em Merinos (verão), não havendo diferenças entre as outras estações do ano para esta raça. Estes resultados denotam uma maior amplitude na estação reprodutiva de carneiros Merino e concordam com as considerações de ROSA e BRYANT (2003). Estes autores explicam que a reprodução sazonal ocorre em espécies selvagens como resultado da seleção natural, enquanto que a domesticação e a seleção artificial contribuem para minimizar os efeitos da estação na atividade reprodutiva. No presente trabalho os maiores níveis de testosterona ocorreram no verão (fevereiro) e os menores no inverno (julho) (FIGURA 10). Estes resultados diferem em um mês, no pico de verão, em relação aos obtidos por BIELLI *et al.* (1999) que estudando carneiros Corriedale (latitude 32°S) observaram picos máximos e mínimos de CE coincidentes com os momentos de picos de testosterona. Estes pesquisadores constataram que os menores valores médios de CE (26, 4 cm) ocorreram no inverno (julho), o mesmo foi verificado com os níveis séricos de testosterona (1,9 nmol/l). Os maiores valores de CE foram encontrados no final do verão e outono (março = 33,3 cm e abril = 32,1 cm), assim como os picos de testosterona (19,7 e 40,9 nmol/l). RHIM *et al.* (1993) também observaram maiores concentrações médias de testosterona no final do verão (setembro) em carneiros Hampshire Down (latitude 40°N).

As menores concentrações de testosterona, no presente experimento, coincidiram com o mês de menor CE e o pico de testosterona ocorreu um mês antes da maior medida de CE (FIGURA 10). Esta antecipação do pico de testosterona em relação à medida de CE pode ter uma função importante na reprodução. O aumento antecipado da secreção de testosterona permite completar plenamente a espermatogênese e determina mudanças comportamentais (lutas entre machos)

para seleção natural de reprodutores dominantes antes do início da estação reprodutiva das fêmeas (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2005).

Constatou-se alta variação de concentração de testosterona entre os animais para amostras de soro colhidas no mesmo momento, o que determinou uma grande dispersão denotada por desvios-padrão relativamente altos (TABELA 3). Estas grandes variações também foram observadas por GOMES e JOYCE (1975) ao verificarem que a concentração de testosterona varia episodicamente no mesmo carneiro sem sincronismo entre momento do dia ou atividade sexual. Carneiros com baixas médias de testosterona apresentam alguns picos curtos, enquanto que carneiros com concentrações médias altas de testosterona exibem picos altos, em ambos os casos as concentrações séricas caem até níveis basais entre os momentos de picos. Os mesmos autores verificaram variações menores de testosterona entre carneiros nos meses de valores médios baixos, enquanto que as oscilações no período de maior concentração média foram mais elevadas. Estas oscilações parecem não estar relacionadas à hora do dia, já que, neste experimento, as amostras foram colhidas em horário padronizado. SOUZA *et al.* (2000) também não observaram nenhuma alteração no ritmo circadiano de secreção e liberação de testosterona em carneiros Ideal ao utilizarem 12 colheitas de sangue nas 24 horas do dia. As oscilações dos níveis de testosterona entre amostras colhidas no mesmo momento podem ser explicadas pela quantidade de testosterona produzida em resposta aos pulsos de LH que é diferente conforme a época do ano (RHIM *et al.*, 1993).

Vários tecidos-alvo são afetados e modificam-se em função do fotoperíodo. Há uma forte correlação do estado morfológico do trato reprodutivo com a secreção de testosterona em raças ou espécies (como os muflões) que possuem uma curta estação reprodutiva. Porém, em animais com uma estação reprodutiva menos marcada, as variações de testosterona podem não coincidir exatamente com as mudanças morfológicas de outros órgãos do aparelho reprodutivo em todas as raças ovinas (SANTIAGO-MORENO *et al.*, 2005). Estes autores observaram mudanças nas glândulas sexuais acessórias de muflões, apesar de menos aparentes do que nos testículos, durante as diferentes estações do ano significativamente correlacionadas com as concentrações plasmáticas de testosterona. Os maiores tamanhos de glândulas vesiculares foram encontrados no outono. GASTEL *et al.*, (1995) observaram que as vesículas seminais demonstraram maior atividade

secretora durante o outono e a menor durante o inverno em carneiros Corriedale. Das glândulas sexuais acessórias presentes nos carneiros, as mais desenvolvidas são as glândulas vesiculares (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). Segundo COLE e CUPPS (1984), as variações do volume do ejaculado não refletem somente a quantidade de espermatozóides produzidos, mas também as mudanças sazonais na síntese e liberação de plasma seminal das glândulas acessórias que são ativadas quando os níveis de testosterona são mais altos durante a estação reprodutiva.

No presente experimento observou-se alteração significativa do volume do ejaculado conforme o mês do ano, ocorrendo alta correlação entre esta característica e a CE (TABELA 5). Verificou-se que, mesmo avaliando-se ejaculados em intervalos relativamente longos (quinzenalmente), esta metodologia se mostrou eficaz para constatar maiores volumes seminais durante o verão e começo do outono e menores valores no inverno (julho). CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) afirmam que as variações na produção espermática somente podem ser observadas em ejaculados se a colheita de sêmen for suficientemente freqüente. Da mesma forma que no presente trabalho, MIES FILHO *et al.* (1981) e BICUDO (1998) no Brasil, também observaram nítida diminuição do volume seminal no inverno. No hemisfério norte, resultados semelhantes foram observados por KAFI *et al.* (2004) em carneiros Karakul (latitude 29°N) que apresentaram maiores volumes de sêmen no final do verão e outono. GUNDOGAN (2007) também obteve maiores volumes de sêmen no outono. Resultados diferentes foram obtidos por IBRAHIM (1997) ao observar, em carneiros egípcios, menores volumes de ejaculado no outono (0,67 ml) em relação às outras estações do ano (0,77 ml). Estas variações podem ter ocorrido devido às influências regionais da temperatura ambiental as quais afetam diretamente a qualidade do sêmen (MATTOS *et al.*, 1984; KARAGIANNIDIS *et al.*, 2000). A temperatura testicular dos carneiros é mantida em 5°C abaixo da temperatura corporal e temperaturas ambientais muito altas podem alterar profundamente a fertilidade de carneiros (CLARKE e TILBROOK, 1992). Especialmente para raças importadas de climas temperados, temperaturas extremas provocam diminuição da motilidade espermática e aumento na quantidade de espermatozóides morfolologicamente anormais, independentemente do fotoperíodo (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991). Por outro lado, a temperatura por si não pode alterar o ritmo reprodutivo anual quando se mantém um fotoperíodo constante, mas pode modificar o momento de início da estação sexual (DUTT e BUSH, 1955).



Outra característica seminal que oscilou significativamente durante os meses, no presente trabalho, foi a concentração de espermatozóides no ejaculado (TABELA 5). Os menores valores de concentração espermática ( $1.855 \times 10^6$  espermatozóides/ml) ocorreram em julho (inverno) e as médias mais altas ( $3.703 \times 10^6$  espermatozóides/ml) foram verificadas em outubro (primavera). No entanto, ao se confrontar diversas pesquisas, verifica-se que os picos de maiores e menores concentrações espermáticas não parecem obedecer a um padrão sazonal definido em diferentes raças. BICUDO (1998) não constatou diferenças sazonais na concentração espermática (espermatozóides/ml de sêmen) em carneiros Ideal. KARAGIANNIDIS *et al.* (2000) verificaram as maiores concentrações espermáticas no outono e inverno nas duas raças locais estudadas, ao passo que IBRAHIM (1997), estudando raças locais na Grécia e cruzas com Chios, detectou menores contagens espermáticas no outono e maiores no verão. As concentrações no inverno e primavera foram próximas e intermediárias em relação às demais estações. No presente trabalho foi possível constatar correlação positiva entre o volume e a concentração espermática do ejaculado (TABELA 5). KAFI *et al.* (2004) sugerem que alterações no volume do ejaculado podem explicar mais de 70% da variação da produção espermática, ao observarem correlação altamente significativa entre volume do ejaculado e produção espermática diária. Em nosso estudo, o momento em que se verificou a menor média de concentração espermática (julho - inverno) coincidiu com o mês em que foram observados os menores valores de CE e menor volume seminal. DUFOUR *et al.* (1984), trabalhando com carneiros Suffolk e DLS no Canadá, também encontraram variações de produção espermática ao longo do ano, seguindo um padrão semelhante àquele demonstrado pelo desenvolvimento testicular. Porém, DICKSON e SANGFORD (2005) não encontraram correlação da produção espermática com a massa testicular e verificaram que embora a massa testicular tenha reduzido em até 20% durante o inverno, a produção espermática não declinou neste período. Os autores sugerem que a perda de massa testicular no início da regressão pode ter ocorrido por decréscimo na produção de fluido pelos túbulos seminíferos. Porém, outro fator importante que pode desvincular o valor da massa testicular com a produção espermática, especialmente no início do decréscimo da CE, é que existem importantes reservas extragonadaís de espermatozóides. Segundo EVANS e MAXWELL (1987) somente a cauda do epidídimo pode conter entre 12 a 16 bilhões armazenados, sendo que estes

espermatozóides são viáveis por até 60 dias antes de serem absorvidos ou naturalmente expelidos (CHEMINEAU e COGNIÉ, 1991).

No presente experimento, considerando as outras características físicas do sêmen estudadas, não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros motilidade progressiva, vigor ou turbilhonamento entre os meses ou estações do ano (TABELA 4). Os valores médios de motilidade progressiva, vigor e turbilhonamento oscilaram entre: 62,0 % a 76,67%, 3,06 a 3,46 e 2,75 a 3,44, respectivamente. MICKELSEN *et al.* (1981) também não observaram variação significativa na motilidade total entre o inverno (61%) e verão (68%) em carneiros Suffolk. KAFI *et al.* (2004), na raça Karakul, obtiveram turbilhonamento significativamente maior no outono em relação às outras estações do ano, e também verificaram diferenças significativas entre carneiros nos parâmetros turbilhonamento e circunferência escrotal. Considerando vários parâmetros, estes autores constataram que sêmen de melhor qualidade foi produzido no final do verão e outono. Porém, BARBAS *et al.* (2001) detectaram menor motilidade na primavera em carneiros Merino e carneiros Serra da Estrela. BICUDO (1998) trabalhando com ovinos Ideal em Botucatu (22°53'S) observou motilidade espermática significativamente melhor no verão e outono (aproximadamente 75%) e significativamente inferior no inverno (63,7%). O vigor apresentou-se inferior no inverno (3,4 em escala de 1-5) e sem variações significativas nas demais estações do ano (entre 3,7 a 4,3). GUNDOGAN (2007) também obteve sêmen de melhor qualidade durante o final de verão e início de outono em carneiros Chios e Daglic considerando várias características avaliadas. Especificamente o parâmetro motilidade espermática apresentou melhores índices no outono e piores no verão. Estas variações de resultados entre os autores poderia ter ocorrido devido às diferentes respostas que as diversas raças ovinas apresentam em relação ao fotoperíodo, assim como as interferências de outros fatores que atuam sobre a qualidade espermática: temperatura ambiental, velocidade do vento, umidade relativa do ar ou sistemas de criação (TUTIDA, 1997).

No que diz respeito às características morfológicas do sêmen não foram encontradas diferenças significativas, na média de defeitos maiores, defeitos menores ou total de defeitos das células espermáticas, durante os meses do ano (TABELA 7). A porcentagem de anormalidades totais oscilou entre 7,5% a 13,18%. Estes valores encontram-se dentro da faixa de variação aceitável para exames andrológicos de ovinos considerados férteis pelo padrão do Colégio Brasileiro de

Reprodução Animal (FONSECA *et al.*, 1992). GASTEL *et al.* (1995) também não observaram diferença significativa na patologia espermática em carneiros Corriedale nas diferentes estações do ano. Todavia, BICUDO (1998) observou número significativamente maior de espermatozóides com defeito nos meses de julho a setembro (inverno) em relação aos outros meses do ano, apesar das porcentagens de defeitos (7,6% a 18,4%) não serem muito diferentes das encontradas no presente trabalho. GARCIA-DERAGON *et al.* (1985) trabalhando com carneiros Corriedale (n=8) na latitude de 32°S, verificaram mudanças na taxa de espermatozóides normais de aproximadamente 75% em dezembro para aproximadamente 58% em julho e atribuíram este fato à ação maior do fotoperíodo e menores temperaturas do que a fatores ligados à alimentação, mesmo que nesta época a oferta de alimento tenha diminuído. MIES FILHO *et al.* (1993) encontraram 73,9% de defeitos no mês de fevereiro em carneiros Hampshire Down (n=10) no Rio Grande do Sul e apenas 17,5% em janeiro do ano seguinte, mas atribuiu esta diferença a pouca idade dos animais no início do experimento (6 meses). MICKELSEN *et al.* (1982) verificaram taxas altas de anormalidades espermáticas durante o ano todo nos Estados Unidos, porém houve diferença significativa entre os meses na média de carneiros de várias raças sendo setembro (outono) o mês no qual foram encontrados maiores valores de células normais (82,3%) e fevereiro (inverno) as menores taxas 57,8%. GUNDEGAN (2007) pesquisando as raças Chios e Daglic a 38° de latitude observou menor porcentagem de espermatozóides anormais durante o outono, enquanto que as maiores ocorrências de anormalidades foram verificadas no verão.

As alterações no peso/volume testicular, devido às mudanças de luminosidade do ambiente, são conseqüências de fenômenos degenerativos dentro do processo de espermatogênese, o qual pode afetar a quantidade e a qualidade de espermatozóides secretados na luz dos túbulos seminíferos (HOCHEREAU de REVIERS *et al.*, 1976). As avaliações de cortes histológicos de túbulos seminíferos de carneiros submetidos a fotoperíodo natural geram informações importantes para quantificar e qualificar as influências da luminosidade sobre a capacidade reprodutiva em diversas raças ou latitudes. Para WROBEL *et al.* (1995), as mudanças no tamanho testicular refletem diretamente no diâmetro dos túbulos seminíferos e modificam a produção espermática, uma vez que o tecido tubular corresponde de 70 a 83% de todo o tecido testicular. E, ainda, não há alteração significativa na quantidade absoluta de tecido intersticial ao longo do ano (OLDHAM

*et al.*, 1978; GASTEL *et al.*, 1995). No presente experimento observou-se que a média do diâmetro dos túbulos seminíferos aumentou 1,32 vezes, passando de 180,46  $\mu\text{m}$  para 238,27  $\mu\text{m}$ , nos momentos de maior (final do verão) e de menor CE (inverno) (TABELA 8). É importante ressaltar que o aumento do diâmetro tubular ocorreu por espessamento das camadas celulares e não por aumento da luz tubular. Esta informação é fundamentada na constatação de que, nos testículos com maior CE, a espessura e o número de camadas celulares foram significativamente superiores em relação aos testículos colhidos no momento de menor CE. O maior número de células germinativas encontradas na fase de maior CE denota maior trofismo deste tecido neste momento. Medidas de diâmetro tubular semelhantes aos encontrados no presente experimento, foram observados por SCHANBACHER e FORD (1979). Em carneiros cruzados Suffolk-Hampshire Down, estes autores observaram diminuição no peso testicular de 477g para 330g na fase de dias longos em relação aos dias curtos. Esta variação refletiu em diferença de 245 $\mu\text{m}$  para 189 $\mu\text{m}$  no diâmetro dos túbulos seminíferos. GASTEL *et al.* (1995) observaram, em carneiros Corriedale, que o maior diâmetro dos túbulos seminíferos ocorreu durante o outono (233  $\mu\text{m}$ ), coincidindo com maior CE e maiores níveis de testosterona e o menor diâmetro foi constatado no inverno (154,5  $\mu\text{m}$ ). Houve um declínio médio da CE de 34% até o inverno e, após este momento, ocorreu novamente um aumento gradual e lento desta medida.

OLDHAM *et al.* (1978) também observaram correlação entre tamanho testicular e diâmetro de túbulos seminíferos, além de aumento na capacidade de produção de espermatozóides em testículos maiores. Estes pesquisadores, estudando efeitos do incremento da dieta nas funções reprodutivas, observaram que o aumento do volume testicular, de 418g para 521g, causou aumento do diâmetro dos túbulos e na produção de espermatozóides de 18 para 26 X 10<sup>6</sup> por grama de parênquima por dia. Sabendo que a otimização da produção espermática resulta em ejaculados mais concentrados, os resultados obtidos em nosso trabalho confirmam as informações do experimento supra citado, uma vez que, no momento de menor CE, houve significativa diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, juntamente com significativa diminuição da concentração espermática nos ejaculados. Verificou-se que as amostras de tecido colhidas de diferentes regiões do mesmo testículo apresentaram diâmetro de túbulos seminíferos muito semelhantes o que denota homogeneidade do tecido testicular independente da região amostrada. Este padrão

pôde ser observado tanto nas amostras colhidas na época de maior quanto de menor CE corroborando os resultados obtidos por GASTEL *et al.* (1995) em carneiros Corriedale.

Estudos histológicos detalhados do significado funcional do crescimento testicular revelam a existência de várias modificações neste tecido que levam ao aumento da produção espermática (OLDHAM *et al.*, 1978). O número de espermatozóides produzidos, por grama de parênquima testicular por dia (eficiência da espermatogênese) é influenciado pela degeneração das células germinativas, puberdade, idade e estação do ano. A degeneração pode ser quantificada através da contagem do número de células germinativas em vários estágios de desenvolvimento ao longo da espermatogênese (JOHNSON e EVERITT, 2000). No presente experimento, houve diferenças significativas no número médio de todas as células da linhagem germinativa entre testículos colhidos no final do verão (março) e no inverno (julho). A maior diferença na média da contagem celular entre os dois momentos foi observada para espermátides alongadas (70,98 e 14,56) seguida pela diferença no número médio de espermátides redondas entre verão e inverno (76,37 e 32,94) (FIGURA 13). As modificações no número médio de espermatogônias e de espermatócitos foram de 40,88 para 27,99 e 38,61 para 24,96, respectivamente. SCHANBACHER e FORD (1979), através dos resultados obtidos, levantam a hipótese de que o fotoperíodo regula a espermatogênese interferindo no número de espermatócitos que completam a meiose, ou controlando o número de espermatogônias que entram no ciclo espermático e ainda alterando a taxa de degeneração celular durante o processo. JOHNSON *et al.* (2000) sustentam esta hipótese, pois verificaram, em garanhões, que a estação do ano afetou o número de diferentes subtipos de espermatogônias. O número de espermatogônias A + B por testículo durante a estação reprodutiva foi 71% maior comparado à estação de anestro sazonal.

Quatro espermátides podem ser formadas após a meiose de cada espermatócito primário. Porém, este é um processo crítico e sua eficiência pode ser modificada por condições ambientais como o fotoperíodo (COUROT, 1967). Os resultados do presente experimento confirmam alterações na eficiência nesta fase de produção de espermatozóides entre os momentos de maior e de menor CE. Foram produzidas em média 73,37 espermátides redondas a partir de 40,88 espermatogônias no verão (testículos maiores), enquanto que no inverno (testículos

menores), obteve-se 32,94 espermátides redondas de 27,99 espermatogônias existentes. SCHANBACHER e FORD (1979), JOHNSON e EVERITT (2000); JOHNSON *et al.* (2000) também observaram que a maior parte da perda celular ocorreu durante a primeira ou segunda etapa da meiose, particularmente durante a fase de paquíteno. JOHNSON (1986) encontrou 40 a 50% menos espermátides depois de submeter carneiros a dias longos. Números muito semelhantes de espermátides redondas aos obtidos no presente experimento, foram obtidos por SCHANBACHER e FORD (1979). Estes pesquisadores submeteram carneiros cruzados (Suffolk e Hampshire Down) a dias curtos ou dias longos e observaram 65,6 e 35,4 espermátides redondas, respectivamente.

Em nossos experimentos também foi observada perda celular mais acentuada durante o processo de espermiação no inverno em relação ao verão (FIGURA 13). JOHNSON (1986) observou perdas de até 6% nesta fase da espermatogênese em garanhões dependendo da estação do ano, mas degenerações nesta fase em touros não foram significativas.

Não foram observadas mudanças significativas no número médio de células de Sertoli entre testículos dos animais quer seja no inverno ou no verão (FIGURA 13). Entretanto BIELLI *et al.* (1999) observaram diminuição no volume dos testículos e diâmetro dos túbulos seminíferos em carneiros Corriedale entre o outono e inverno com diminuição significativa no número de células de Sertoli. Os autores postulam que tenha ocorrido a morte de parte destas células no inverno.

Os comandos hormonais são as chaves reguladoras da espermatogênese e também da massa e tamanho testicular em carneiros adultos, sendo que os principais hormônios envolvidos são o FSH e a testosterona. A testosterona é um dos hormônios reguladores da proliferação espermatogênica e as variações das taxas deste hormônio são modificadas, entre outros fatores, pelo fotoperíodo (SOUZA *et al.* 2000,).

No presente experimento verificou-se que, quando os diâmetros dos túbulos seminíferos eram menores ocorriam as menores taxas de testosterona e os maiores níveis ocorreriam aproximadamente um mês antes da maior CE, quando os túbulos apresentaram maior diâmetro. GASTEL *et al.*, (1995) encontraram correlação entre níveis de testosterona, circunferência escrotal e diâmetro dos túbulos seminíferos, porém, consideram que a relação entre testosterona e tamanho tubular, não é uma relação direta. Isto seria resultado de uma dependência de estimulação do eixo

hipotálamo hipófise e influência mútua entre células de Sertoli e Leydig. Níveis de gonadotrofinas e crescimento testicular não são altamente correlacionadas em todas as raças ovinas.

Levando em conta o conjunto de características reprodutivas avaliadas ao longo de doze meses neste experimento, observou-se melhor qualidade reprodutiva geral dos ovinos no final do verão e começo de outono e diminuição de todos os parâmetros no inverno. Na primavera e verão a maioria das características permaneceu em uma condição intermediária comparadas às observadas nos picos. Os parâmetros que apresentaram maior variação entre as estações do ano foram a CE, concentrações de testosterona, volume e concentração espermática. Sabendo que a maioria destas características é avaliada quando se realiza exame andrológico, torna-se imprescindível conhecer o grau de variação sazonal fisiológica que elas apresentam antes de se condenar um carneiro. A medida da CE tem sido utilizada como importante critério na seleção genética de reprodutores (FERREIRA *et al.*, 1988). Apesar da medida mínima proposta ser de 30cm (BAGLEY, 1997; FONSECA *et al.*, 1992) independente da época do ano, neste experimento a maioria dos carneiros apresentou valores inferiores a este no mês de julho (variação de 23 a 30,5cm). Portanto, ao se realizar exame andrológico único nos meses de inverno, valores inferiores a 30cm podem ser considerados como transitórios e configuram mudanças fisiológicas adaptativas destes animais ao fotoperíodo. Quanto ao volume do ejaculado, apesar da ampla variação observada entre os meses do ano, os volumes máximos e mínimos encontraram-se dentro dos limites sugeridos por FONSECA *et al.* (1992). A concentração média de espermatozóides no ejaculado variou de 1.855 a 3.703 X 10<sup>6</sup> /ml, mas as variações individuais superaram estes valores. Os mesmos autores consideram que as médias normais variam entre 2 a 5 X 10<sup>6</sup> /ml, mas indicam que não há limite mínimo desclassificatório em exame andrológico em função de fatores extrínsecos como: método de colheita, tempo de repouso do reprodutor ou seu condicionamento à colheita.

Um dos objetivos da realização do exame andrológico é a posterior utilização do sêmen em processos biotecnológicos como a preservação do material genético por congelamento e posterior uso na inseminação artificial. CHEMINEAU e COGNIÉ (1991) sugerem que as principais características reprodutivas que devem ser levadas em conta quando os reprodutores ovinos são selecionados para congelamento de sêmen são principalmente a CE e o número de espermatozóides normais.

Sabendo que estas características são variáveis ao longo do ano há a possibilidade de submeter estes carneiros a fotoperíodo artificial, manter alimentação padronizada no ano todo e também alterar o número de colheitas de sêmen diárias para diminuir o efeito das menores quantidades de espermatozóides produzidos durante alguns meses (SIMPLÍCIO, 2007). As variações sazonais observadas no presente experimento, especialmente no que diz respeito ao número total de espermatozóides por ejaculado, afetam diretamente a quantidade de doses de sêmen produzida conforme o mês do ano (TABELA 9). Em produções comerciais de sêmen congelado há a necessidade de previsão de quantidade de doses disponíveis a cada mês. É importante saber que há a possibilidade de ausência de produção de doses em alguns meses (junho/julho), como foi estimado no presente trabalho. Além da variação na quantidade de doses D'ALESSANDRO e MARTEMUCCI (2003), ao avaliarem sêmen ovino congelado em diferentes estações, observaram qualidade significativamente maior, após descongelação, quando utilizaram ejaculados colhidos no verão e outono. Com os resultados obtidos no presente experimento, ao utilizar reprodutores Suffolk em latitudes próximas a 25°, recomenda-se aumentar a relação macho:fêmea em montas naturais no inverno, assim como evitar a congelação de sêmen nesta estação.

Segundo o que se pôde observar, carneiros da raça Suffolk reconhecem a mudança fotoperiódica em baixas latitudes. Este fato foi verificado através da avaliação de vários parâmetros relacionados à reprodução de machos em espécies consideradas sazonais. Neste ponto é necessário enfatizar que outras variáveis ambientais, além do fotoperíodo, devem interferir de forma direta ou indireta nas respostas dos parâmetros observados. Todavia, trabalhos de campo não permitem responder ao certo se uma determinada variável ambiental está atuando como “zeitgeber” ou como um agente mascarador (modulador), mas, algumas inferências são possíveis. As correlações significativas das medidas dos parâmetros com a variação do fotoperíodo é uma indicação de que o ciclo claro/escuro ambiental deve estar atuando como “Zeitgeber”, sincronizando a atividade reprodutiva dessa raça na latitude estudada. Apesar do estudo ter sido realizado durante um ano, as correlações observadas parecem acontecer de forma rítmica. A indicação dessa hipótese está no fato de que nos carneiros rS ocorreu involução testicular no mês de abril e maio, retomando, portanto, um novo ciclo anual. Outras variáveis ambientais



clássicas, porém menos cíclicas do que o fotoperíodo, como temperatura, umidade relativa do ar, e regime de chuvas, apesar de não terem sido levadas em conta no presente estudo, são possíveis candidatas à moduladores dos ritmos e merecem atenção em trabalhos futuros. Porém, não se pode descartar a hipótese de que uma ou outra variável possa atuar como um “Zeitgeber” secundário. Aspectos sociais como a presença de fêmeas em estro pode também contribuir na modulação de respostas rítmicas pela proximidade delas com os machos. No entanto, a comprovação dessas e outras possíveis inferências só serão possíveis com a continuidade deste trabalho experimental. No caso da demonstração do caráter endógeno de um ritmo, como a atividade reprodutiva, somente pode ser feita em condições constantes (livre-curso) isolando o organismo durante vários anos. Da mesma forma, a comprovação do papel de uma variável como “zeitgeber” ou agente mascarador só será possível com a verificação de sua interferência num ritmo endógeno (caso do “Zeitgeber”) ou a modificação instantânea e temporária da expressão desse ritmo (caso do mascaramento).

### **Perspectivas futuras**

Além da necessidade da demonstração do caráter endógeno da sazonalidade reprodutiva em carneiros da raça Suffolk, outros estudos poderão ser realizados a partir do presente trabalho.

Recentemente, a técnica de DNA microarranjos foi efetuada para comparar expressões gênicas dirigidas sazonalmente em testículos de hamsters (*Mesocricetus auratus*). Os autores do trabalho (CHAHAD-EHLERS *et al.*, 2008 em submissão) compararam expressões de RNA de animais expostos a dias curtos (CE 8:16h) por 10 semanas (inférteis), com animais férteis que também foram expostos a esse mesmo fotoperíodo, mas que mantinham testículos funcionais por serem pinealectomizados. Com esta técnica obteve-se uma lista de 284 genes altamente regulados em condições de fertilidade e infertilidade. Da lista de 284, 249 deles apresentaram valores estatisticamente consistentes ( $p < 0,05$ ). Dos 115 que se expressaram em testículos ativos metade dos transcritos (59) possuíam função desconhecida embora a expressão de 73% deles (84) havia sido previamente reportada em testículos. Já aqueles cujos transcritos foram detectados em testículos

inativos (134 genes), 34% (55) eram de função desconhecida, porém 70% deles foram identificados como produto testicular. Tendo estabelecido a utilidade dessa abordagem para estudos da ritmicidade circadiana e sazonal em hamsters, existe agora a necessidade de constatar se esses genes também são bases moleculares na fertilidade de outros mamíferos, sobretudo aqueles de interesse médico e veterinário como é o caso de ovinos da raça Suffolk, conhecidos por apresentarem respostas sazonais bastante peculiares na reprodução. Baseado na disponibilidade de informações do Centro Nacional de Informação em Biotecnologia (NCBI) sobre células e tecidos, observou-se que em alguns casos há diferença clara sobre as localizações dos transcritos detectados. Dos genes de testículos ativos, 49% (41 de 84) são reconhecidos como produtos de espermatídes. Em contraste, somente oito dos genes relacionados a produtos de espermatídes foram detectados em testículos inativos. Uma grande proporção destes transcritos detectados em testículos ativos (49%) são provavelmente produtos de células de Sertoli; no entanto, menos de 30% estão envolvidos em tecidos espermatogenicamente ativos. Um padrão similar foi evidenciado para genes espermatogoniais, mostrando uma incidência elevada em testículos inativos (34%) quando comparado com testículos ativos (17%). Da mesma forma que em hamsters, com estudos futuros da expressão dos mesmos genes em carneiros Suffolk espera-se verificar que mudanças de padrão de expressão gênica sejam consistentes com as mudanças histológicas observadas no ciclo sazonal, com a diminuição e em seguida o ressurgimento de espermatócitos e espermatídes. Conseqüentemente, genes associados com espermatócitos e espermatídes deverão se expressar em níveis mais altos em testículos colhidos no verão do que no inverno e o modelo ora obtido seria útil para testar ou corroborar esta hipótese.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas condições e metodologia empregadas neste experimento permitem concluir que:

1. Reprodutores Suffolk, criados em latitudes 25°25'40"S, apresentam modificações sazonais significativas na reprodução. Na fase adulta, independente da massa corporal e da idade, melhores condições reprodutivas ocorrem no final do verão e condições inferiores ocorrem no inverno sem, no entanto, haver pausa em qualquer época do ano.
2. As medidas de CE utilizadas como parâmetro de seleção genética não devem ser realizadas no inverno em reprodutores Suffolk.
3. O aumento de massa corporal em reprodutores adultos, independente da experiência sexual prévia, não interfere nas oscilações sazonais de tamanho testicular.
4. Níveis séricos de testosterona, CE, volume do ejaculado, diâmetro dos túbulos seminíferos e número de células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos, espermátides redondas e alongadas) são marcadores confiáveis para a detecção de respostas sazonais.
5. A adaptação de uma fórmula de cálculo de volume de um elipsóide proposta neste trabalho a partir de medidas de largura e comprimento testicular para cálculo de volume testicular é uma metodologia prática e apresenta correlação de 0,98 com o volume real.
6. O fato de não ter sido detectado um ritmo sazonal na motilidade progressiva, vigor, turbilhonamento, morfologia espermática e no número de células de Sertoli, não exclui a possibilidade da ocorrência de ritmicidade, já que estes parâmetros podem estar sendo influenciados por outros fatores que estejam modulando estas respostas.
7. Na oscilação sazonal dos perfis de testosterona, os menores níveis coincidem com o momento de menor tamanho testicular e os maiores antecedem em um mês o maior tamanho testicular.
8. Nos exames andrológicos realizados no inverno, a diminuição fisiológica do tamanho testicular, com valores de circunferência escrotal comumente menores que 30 cm, deve ser levada em conta para não ser interpretada como um processo patológico.
9. A variação sazonal da quantidade total de espermatozóides por ejaculado torna a congelação do sêmen, sob ponto de vista comercial, menos viável nos meses de inverno.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLA, D.F. **Principios de fisiologia reproductiva ovina**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1993.
- ABNEY, T.O. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v. 64, p. 610–617, 1999.
- ANDERSON, G.M.; BARREL, G.K. Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on seasonal reproduction in the red deer hind. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 239-250, 1998.
- ARENDT, J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. **Biology of Reproduction**, v. 3, p. 13-22, 1998.
- ASCHOFF, J. Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p. 11-28, 1960.
- ASCHOFF, J. Masking of circadian rhythms by zeitgebers as opposed to entrainment. In: HEKKENS, W.T.J.M.; KERKHOF, G.A.; RIETVELD, W.J. **Trends in Chronobiology**. Oxford: Pergamon Press, 1988. p.149-161.
- AVDI, M.; BANO, G.; STEFO, K.; CHEMINEAU, P. Seasonal variation in testicular volume and sexual behavior of Chios and Serres rams. **Theriogenology**, v. 62, p. 275-282, 2004.
- BAGLEY, C.V. Breeding Soundness Examination of Rams. **Animal Health Fact Sheet**, 1997. Disponível em: <http://extension.usu.edu/files/agpubs/sheep02.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2008.
- BAILEY, T.L.; MONKE, D.; HUDSON, R.S. Testicular shape and its relationship to sperm production in mature Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 46, p. 881-887, 1996.
- BARBAS, J.P.; SOUSA, J.P.F.; FERREIRA, G.M.B.C.; BAPTISTA, M.C.; HORTA, A.E.M. Variação anual das características seminais de carneiros Merino Regional e Serra da Estrela, em sêmen fresco. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, v. 8, p. 312-323, 2001.
- BATH, G.F.; HANSEN, J.W.; KRECEK, R.C.; WYK, J.A. van, VATTA, A.F. **Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats**. Rome: FAO, 2001.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1976.
- BECK, S. D. **Insect photoperiodism**. 2 ed. New York: Academic Press, 1980.

BICUDO, S.D. **Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação de características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima.** Botucatu, 1998. 107p. Tese (Livre-Docência) – Disciplina de Reprodução Animal, Inseminação Artificial e Biotécnicas da Reprodução, UNESP.

BIELLI, A.; PEDRANA, G.; GASTEL, M.T.; CASTRILLEJO, A.; MORANÃ, A.; LUNDEHEIM, N.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ, H. Influence of grazing management on the seasonal change in testicular morphology in Corriedale rams. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 93-105, 1999.

BLOM, E. The ultra structure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinær Medicin**, v. 53, p. 83-391, 1973.

BRAUN, W.F.; THOMPSON, J.M.; ROSS, C.V. Ram scrotal circumference measurements. **Theriogenology**, v. 13, p. 221-229, 1980.

BRINSKO, S.P. Fisiologia Reprodutiva do Macho. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 3 ed., 2004. p.432 – 439.

BROWN, B.W. A review of nutritional influences on reproduction in boars, bulls and rams. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 2, p. 89-114, 1994.

BROWN, J.; WALKER, S. E STEINMAIN, K. **Endocrine manual for the reproductive assessment of domestic and non-domestic species**. Conservation and Research Center. Virginia: Smithsonian's National Zoological Park, Front Royal, 2004.

BRUERE, A.N. Examination of the ram for breeding soundness. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p. 874-880.

CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 77-88, 1988.

CEROVSKY, J. A new staining procedure for boar spermatozoa. **Zivocisna Vyroba**, v. 21, p. 361-362, 1976.

CHEMINEAU, P.; COGNIÉ, Y. **Training manual on artificial insemination in sheep and goats**. Rome: FAO, 1991.

CIPOLLA-NETO, J.; MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Introdução ao estudo da Cronobiologia**. 1ª. ed. São Paulo: Ícone, 1988.

CLARKE, I.J.; TILBROOK, A.J. Influence of non-photoperiodic environmental factors on reproduction in domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 219-228, 1992.

COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. New York: Academic, 1977.

COOKE, P.S.; ZHAO, Y.D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biological Reproduction**, v. 51, p. 1000–1005, 1994.

COUROT, M. Endocrine control of the supporting and germ cells of the impuberal testis. **Journal of Reproduction and Fertility** (Suppl.2), p. 89-101, 1967.

COUROT, M.; ORTAVANT, R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 30, p. 47-60, 1981.

D'ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.93-102, 2003.

DELLMAN, H.D.; WROBEL, K.H. Sistema reprodutor masculino. In: DELLMAN, H.D; BROWN, E.M. **Histologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.233-253.

DICKSON, K.A.; SANFORD, L.M. Breed diversity in FSH, LH and testosterone regulation of testicular function and in libido of young adult rams on the southeastern Canadian prairies. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 189-203, 2005.

DUFOUR, J.J.; FAHMY, M.H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **Journal of Animal Science**, v. 58, p. 416-422, 1984.

DUTT, R.H.; BUSH, F. The effect of low environmental temperature on initiation of the breeding season and fertility in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 14, p. 885-897, 1955.

EILER, H. Glândulas Endócrinas, In: REECE, W.O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. 12 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2006. p.577-622.

EL-ALAMY, M.A.; FOOTE, R.H.; HARE, E. Sperm output and hormone concentrations in Finn and Dorset rams exposed to long and short-day lighting. **Theriogenology**, v. 56, p. 839-854, 2001.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney: Butterworths, 1987.

FERREIRA, J.M.M.; SILVA, J.F.; MORAES, J.C.F. Associação entre caracteres reprodutivos, peso corporal e época do ano e sua potencial importância na seleção de borregos Corriedale. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 12, p. 69-76, 1988.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992.

FOURIE, P.J.; SCHWALBACH, L.M.; NESER, F.W.C.; WESTHUIZEN, C. VAN DER. Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. **Small Ruminant Research**, v. 54, p. 53-59, 2004.

GARCIA-DERAGON, L.A.; PIMENTEL, C.A.; MORAES, J.C.F.; MARURI, A.S.; SOUZA, L.A.P. Variação estacional de características reprodutivas em carneiros com e sem lâ no escroto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 9, p. 119-132, 1985.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 187-211.

GASTEL, T.; BIELLI, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; TAGLE, R.; FRANCO, J.; LABORDE, D.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. **Animal Reproduction Science**, v. 40, p. 59-75, 1995.

GERLACH, T.; AURICH, J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster – a review. **Animal Reproduction Science**, v. 58, p. 197-213, 2000.

GOMES, W.R.; JOYCE, M.C. Seasonal changes in serum testosterone in adult rams. **Journal of Animal Science**, v. 41, p. 1373-1375, 1975.

GRANVILLE, W.A.; SMITH, P.S.; LONGLEY, W.R. **Elementos de cálculo diferencial e integral**. Rio de Janeiro: Editora Científica, 1956.

GROOSE, J.; MAYWOOD, E.S.; EBILNG, F.J.P.; HASTINGS, M.H. Testicular regression in pinealectomized Syrian hamsters following infusions of melatonin delivered on non-circadian schedules. **Biological Reproduction**, v. 49, p. 666-674, 1993.

GÜNDOĞAN, M. Seasonal variation in serum testosterone, T3 and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. **Small Ruminant Research**, v. 67, p. 312-316, 2007.

HANDELSMAN, D.J.; WISHART, S.; CONWAY, A.J. Oestradiol enhances testosterone-induced suppression of human spermatogenesis. **Human Reproduction**, v. 15, p. 672–679, 2000.

HASTINGS, J.W.; RUSAK, B.; BOULOS, Z. Circadian rhythms: the physiology of biological timing. In: PROSSER, C. L. **Neural and integrative animal physiology**. New York: Wiley-Liss Publication, 1991. p.435-546.

HASTINGS, M.H.; FOLLET, B.K. Modifications to the hand-held Gene Gun: improvements for in vitro biolistic transfection of organotypic neuronal tissue. **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, p. 424-430, 2001.

HAZLERIGG, D.C.; MORGAN, P.J.; MESSENGER, S. Decoding photoperiodic time and melatonin in mammals: what can we learn from the pars tuberalis? **Journal of Biological Rhythms**, v. 16, p. 283 – 301, 2001.

HOCHEREAU de REVIERS, M.T.; LOIR, M.C.; PELLETIER, J. Seasonal variations in the response of the testis and LH levels to hemicastration of adult rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 46, p. 203-209, 1976.

HORN, M.M; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Evidência de selecção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogénese. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 97, n. 544, p. 171-174, 2002.

HÖTZEL, M.J.; WALKDEN-BROWN, S.; FISHER, J.S.; MARTIN, G.B. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: responses to a nutritional stimulus in the breeding and non-breeding seasons. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 1-9, 2003.

HULET, C.V.; SHELTON, E.M. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 397-411.

IBRAHIM, S.A. Seasonal variations in semen quality of local and crossbred rams raised in the United Arab Emirates. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 61-167, 1997.

IPARDES. **Perfil municipal de Pinhais**. Disponível em: <[http://www.ipardes.gov.br/perfil\\_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=83320](http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=83320)> Acesso em: 04 jan. 2007.

JABBOUR, H.N.; LINCOLN, G.A. Prolactin receptor expression in the testis of the ram: localisation, functional activation and the influence of gonadotrophins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 148, p. 151-161, 1999.

JOBIM, M.I.M; OBGERST, E.A.; WALD, V.B. Biometria testicular em ovinos de raças de corte. 1. Reprodutores racionados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 13, p. 247-254, 1989.

JOHNSON, L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biology and Reproduction**, v.32, p.1181-1190, 1986.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 471-480, 2000.

JOHNSON, M.H.; EVERITT, B.J. **Essential Reproduction**. 5. ed. Oxford: Blackwell Science, 2000.

KAFI, M.; SAFDARIAN, M.; HASHEMI, M. Seasonal variation in semen characteristics, scrotal circumference and libido of Persian Karakul rams - technical note. **Small Ruminant Research**, v. 53, p. 133-139, 2004.

KARAGIANNIDISA, A.; VARSAKELIB, S.; ALEXOPOULOSA, C.; AMARANTIDIS, I. Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Friesian rams in Greece. **Small Ruminant Research**, v. 37, p. 125-130, 2000.



KILGOUR, R.J.; COUROT, M.; PISSELET, C.; DUBOIS, M.P.; SAIRAM, M.R. Inhibition of FSH but not LH affects spermatogenesis in the mature ram. **Animal Reproduction Science**, v. 34, p. 253-264, 1994.

KNIGHT, T.W. Methods for the indirect estimation of testes weight and sperm numbers in Merino e Romney rams. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 20, p. 291-296, 1977.

LAND, R.B. The expression of female sex limited characters in male. **Nature**, v. 241, p. 208-209, 1973.

LINCOLN, G.A.; SHORT, R.V. Seasonal breeding: nature's contraceptive. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 36, p. 1-51, 1980.

LINCOLN, G.A. Seasonal aspects of testicular function. In: BURGER, H.; De KRETZER, D. (Ed.). **The Testis**. Raven : New York, 1989. p. 329-385.

LINCOLN, G.A.; LINCOLN, C.E.; NEILLY, S.M. Seasonal cycles in the blood plasma concentration of FSH, inhibin and testosterone, and testicular size in rams of wild, feral and domesticated breeds of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 623-633, 1990.

LINCOLN, G.A. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 203-217, 1992.

LINCOLN, G.A. Effects of placing micro-implants of melatonin in the pars tuberalis, pars distalis and the lateral septum of the forebrain on the secretion of FSH and prolactin, and testicular size in rams. **Journal of Endocrinology**, v. 144, p. 471-481, 1994.

LINCOLN, G.A.; ANDERSSON, H.; LOUDON, A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. **Journal of Endocrinology**, v. 179, p. 1-13, 2003.

LINCOLN, G.A. Melatonin entrainment of circannual rhythms. **Chronobiology International**, v. 23, p. 301 – 306, 2006.

LINCOLN, G.A.; CLARKE, I.J.; HUT, R.A.; HAZLERIGG, D.G. Characterizing a Mammalian Circannual Pacemaker. **Science**, v. 314, p. 1941-1944, 2006.

MCLACHLAN, R.I.; WREFORD, N.G.; O'DONNELL, L.; DE KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M.. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. **Journal of Endocrinology**, v. 148, p.1–9, 1996.

MALPAUX, B.; ROBINSON, J.E.; WAYNE, N.L.; KARSCH, F.J. Regulation of the onset of the breeding season of the ewe: importance of long days and of an endogenous reproductive rhythm. **Journal of Endocrinology**, v. 122, p. 269-278, 1989.

MARQUES, M.D., GOLOMBEK, D.; MORENO, C. Adaptação temporal. In: MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. São Paulo: Edusp. 1997. p.45-84.

MARQUES, N.; MENNA-BARRETO, L. **Cronobiologia: princípios e aplicações**. 1ª. ed. São Paulo: Edusp, 1997.

MARTIN, G.B.; HÖTZEL, M.J.; BLACHE, D.; WALKDEN-BROWN, S.W.; BLACKBERRY, M.A.; BOUKHLIQ, R.; FISHER, J.S.; MILLER, D.W. Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of responses to photoperiod by an annual cycle in food supply. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, p. 165-175, 2002.

MARTINS, R.D.; MCMANUS, C.; CARVALHÊDO, A.S.; BORGES, H.V.; SILVA, A.E.D.F.; SANTOS, N.R. Avaliação reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1594-1603, 2003.

MATTOS, R.C; GÜNZER, A.R.; NEVES, J.P. Influências sazonais sobre o sêmen de carneiros da raça Merino Alemão tipo carne, dando especial ênfase à patologia de acrossoma. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 8, p. 47-56, 1984.

MICKELSEN, W.D.; PAISLEY, L.G.; DAHMEN, J.J. The effect of season on the scrotal circumference and sperm motility and morphology in rams. **Theriogenology**, v. 16, p. 45-51, 1981.

MICKELSEN, W.D.; PAISLEY, L.G.; DAHMEN, J.J. Seasonal variations in scrotal circumference, sperm quality and sexual ability in rams. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 376-380, 1982.

MIES FILHO, A.; GIRÃO, R.N.; DUTRA, J. Congelação de sêmen ovino na primavera. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 5, p 27-37, 1981.

MIES FILHO, A.; JOBIM, M.I.M; OBERST, E.R.; WALD, V.B. Variação estacional da produção espermática e do perímetro escrotal de ovinos da raça Hampshire Down. **A Hora Veterinária**, v. 73, p. 53-57, 1993.

MORAES, J.F.C. Avaliação reprodutiva no carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 10-19, 1997.

MORAES, J. C. F.; OLIVEIRA, N. M. Método para avaliação de carneiros Romney Marsh baseado no tamanho testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 16, p. 55-62, 1992.

MORENO, R.D.; RAMALHO-SANTOS, J.; SUTOVSKY, P.; CHAN, E.K.; SCHATTEN, G. Vesicular traffic and golgi apparatus dynamics during mammalian spermatogenesis: implications for acrosome architecture. **Biological Reproduction**, v. 63, p. 89–98, 2000.

NRC. **Nutrient requirements of sheep**. 6º ed. Washington: National Academic Press, 1985.

OBSERVATÓRIO NACIONAL. **Anuário interativo do observatório nacional**. Disponível em: <<http://euler.on.br/ephemeris/index.php>> Acesso em: 04 jan. 2007.

OLDHAM, C.M.; ADAMS, N.R.; GHERARDI, P.B.; LINDSAY, D.R.; MACKINTOSH, J.B. The influence of level of feed intake on sperm producing capacity of testicular tissue in the ram. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29. p. 173-179, 1978.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v. 22, p. 289 – 318, 2001.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. Espermatogénesis em los mamíferos domésticos. In: COLE, H.H.; CUPPS, P.T. **Reproduccion de Los Animales Domésticos**. Zaragoza: Acribia, 1984. p. 170-190.

PELLETIER, J.; ALMEIDA, G. Short light cycles induce persistent reproductive activity in Ile-de-France rams. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 215-226, 1987.

PENTIKAINEN, V.; ERKKILA, K.; SUOMALAINEN, L.; PARVINEN, M.; DUNKEL, L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis *in vitro*. **Journal of Clinical Endocrinological Metabolism**, v. 85, p.2057–2067, 2000.

PITTENDRIGH, C. S. Circadian rhythms and circadian organization of living systems. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p.159-184, 1960.

PURVIS, I.W.; PIFER, L.R.; EDEY, T.N.; KILGOUR, R.J. The genetic relationship between ovulation rate and testicular diameter in a random-breeding Merino flock. **Livestock Production Science**, v. 18, p. 35-54, 1988.

REEVES, J.J. Neuroendocrinologia da reprodução. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 1988. p. 128-144.

RHIM, T.J.; KUEHL, D.; JACKSON, G.L. Seasonal changes in the relationships between secretion of gonadotropin-releasing hormone, luteinizing hormone, and testosterone in the ram. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 197-204, 1993.

ROBINSON, J.E.; KARSCH, J. Photoperiodic history and a changing melatonin pattern can determine the neuroendocrine response of the ewe to daylength. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 80, p. 6159-6165, 1987.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. The 'ram effect' as a way of modifying the reproductive activity in the ewe - Review. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 1-16, 2002.

ROSA, H.J.D.; BRYANT, M.J. Seasonality of reproduction in sheep – a review. **Small Ruminant Research**, v. 48, p. 155-171, 2003.

RUSSEL, A.J.F.; DONEY, J.M.; GUNN, R.G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal Agricultural Science**, v. 72, p. 451-454, 1969.

SALISBURY, G.W.; VANDEMARK, N.L.; LODGE, J.R. **Fisiologia de la reproduccion e inseminacion artificial de los bovidos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1982.

SANTIAGO-MORENO, J.; GOMEZ-BRUNET, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TOLEDANO-DÍAZ, A.; MALPAUX, B.; LOPEZ-SEBASTIAN, A. Differences in reproductive pattern between wild and domestic rams are not associated with inter-specific annual variations in plasma prolactin and melatonin concentrations. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, p. 416-429, 2005.

SANTOS, M.B. As três carnes de ovinos no Brasil. **O Berro**, v. 79, p.19 - 26, 2005.

SAUNDERS, P.T.; MAJDIC, G.; PARTE, P.; MILLAR, M.R.; FISHER, J.S.; TURNER, K.J.; SHARPE, R.M.. Fetal and perinatal influence of xenoestrogens on testis gene expression. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 424, p. 99–110, 1997.

SCHANBACHER, B.D; FORD, F.F. Photoperiodic regulation of ovine spermatogenesis: relationship to serum hormones. **Biology of Reproduction**, v. 20, p. 719-726, 1979.

SCOTT, C.J.; MARIANI, M.; CLARKE, I.J.; TILBROOK, A.J. Effect of testosterone and season on proenkephalin messenger RNA expression in the preoptic area of the hypothalamus in the ram. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 2015-2021, 2003.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.234-246, 2007.

SOUZA, M. I. L.; URIBE-VELASKEZ, L. F.; BICUDO, S. D.; SOUSA, D. B.; RAMOS, A. A.; BLAYA, M.C.R. Ritmos circadianos de las concentraciones plasmáticas de testosterona y androstenediona en carneros Ideal en Botucatu – SP – Brasil. In: ENCUENTRO DE MEDICINA DE PEQUEÑOS RUMINANTES DEL CONE SUR Y CONGRESO ARGENTINO DE ESPECIALISTAS EN PEQUEÑOS RUMINANTES Y CAMELÍDEOS SUDAMERICANOS, 3., 2000, Buenos Aires. **Memorias...** Buenos Aires, 2000, 1 CD-ROM.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOTOMAIOR, C.S.; SOUZA, F.P.; CASTRO, E.A.; PESSOA, M.C.; MILCZEWSKI, V.; TEIXEIRA, V.N. Occurrence of resistance of anthelmintics in sheep in Paraná state, Brazil. **Veterinary Record**, v. 139, p. 421-422, 1996.

THOMAZ-SOCCOL, V.; SOUZA, F. P.; SOTOMAIOR, C. S.; CASTRO, E. A.; MILCZEWSKI, V.; MOCELIN, G.; SILVA, M. Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovis aries*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, p. 41-47, 2004.

TILBROOK, A.J.; KRETZER, D. M. de; CLARKE, I.J. Seasonal changes in the negative feedback regulation of the secretion of the gonadotrophins by testosterone and inhibin in rams. **Journal of Endocrinology**, v. 160, p. 155-167, 1999.

TUTIDA, L. **Influência das estações do ano na temperatura retal, frequência respiratória e características seminais de carneiros**. Maringá, 1997. 67p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Maringá.

UNANIAN, M.M.; FELICIANO SILVA, A.E.D.; McMANUS, C. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 136-144, 2000.

VON GALL, C.; GARABETTE, M.L.; KELL, C.A.; FRENZEL, S.; DEHGHANI, F.; SHUMM-DRAEGER, P.M.; WEAVER, D.R.; KORF, H.W.; HASTINGS, M.H.; STEHLE, J.H. Rhythmic gene expression in pituitary depends on heterologous sensitization by the neurohormone melatonin. **Nature Neuroscience**, v. 3, p. 234-238, 2002.

WROBEL, K-H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annal of Anatomy**, v. 177, p. 19-32, 1995.

WOODFILL, C.J.; WAYNE, N.L.; MOENTER, S.M.; KARSCH, F.J. Photoperiodic synchronization of circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific cues. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 965-976, 1994.

YARNEY, T. A.; SANFORD, L. M.; PALMER, W. M. Pubertal development of ram lambs: body weight and testicular size measurements as indices of post-pubertal reproductive function. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 70, p. 139, 1990.

## ANEXO 1

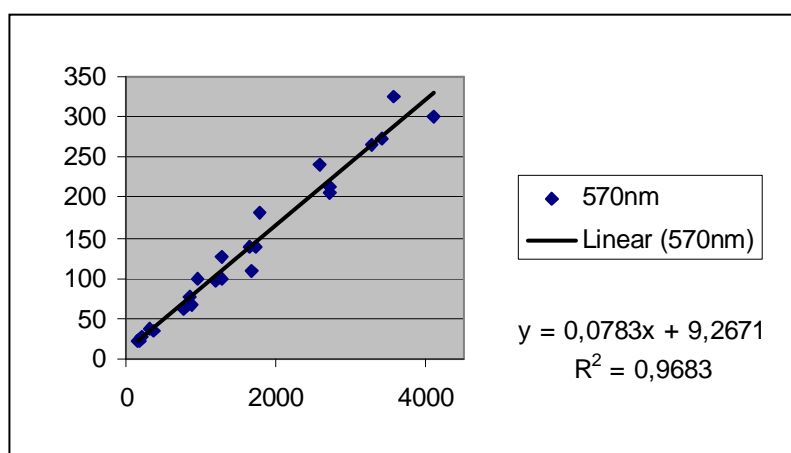
Nascer e ocaso do sol em latitude 25°25'40''S, segundo OBSERVATÓRIO NACIONAL (2007)

| <b>Data</b>   | <b>Nascer</b> | <b>Transição</b> | <b>Ocaso</b> | <b>Data</b>   | <b>Nascer</b> | <b>Transição</b> | <b>Ocaso</b> |
|---------------|---------------|------------------|--------------|---------------|---------------|------------------|--------------|
| <b>1/jan</b>  | 05:30         | 12:21            | 19:11        | <b>1/jul</b>  | 07:04         | 12:21            | 17:39        |
| <b>6/jan</b>  | 05:33         | 12:23            | 19:12        | <b>6/jul</b>  | 07:04         | 12:22            | 17:41        |
| <b>11/jan</b> | 05:37         | 12:25            | 19:13        | <b>11/jul</b> | 07:04         | 12:23            | 17:43        |
| <b>16/jan</b> | 05:41         | 12:27            | 19:13        | <b>16/jul</b> | 07:03         | 12:24            | 17:45        |
| <b>21/jan</b> | 05:45         | 12:28            | 19:12        | <b>21/jul</b> | 07:01         | 12:24            | 17:47        |
| <b>26/jan</b> | 05:49         | 12:30            | 19:10        | <b>26/jul</b> | 06:59         | 12:24            | 17:50        |
| <b>1/fev</b>  | 05:54         | 12:31            | 19:08        | <b>1/ago</b>  | 06:56         | 12:24            | 17:53        |
| <b>6/fev</b>  | 05:57         | 12:32            | 19:06        | <b>6/ago</b>  | 06:52         | 12:24            | 17:55        |
| <b>11/fev</b> | 06:01         | 12:32            | 19:03        | <b>11/ago</b> | 06:49         | 12:23            | 17:57        |
| <b>16/fev</b> | 06:04         | 12:32            | 18:59        | <b>16/ago</b> | 06:45         | 12:22            | 17:59        |
| <b>21/fev</b> | 06:07         | 12:31            | 18:55        | <b>21/ago</b> | 06:40         | 12:21            | 18:01        |
| <b>26/fev</b> | 06:10         | 12:31            | 18:51        | <b>26/ago</b> | 06:36         | 12:19            | 18:03        |
| <b>1/mar</b>  | 06:12         | 12:30            | 18:48        | <b>1/set</b>  | 06:30         | 12:18            | 18:06        |
| <b>6/mar</b>  | 06:14         | 12:29            | 18:43        | <b>6/set</b>  | 06:25         | 12:16            | 18:08        |
| <b>11/mar</b> | 06:17         | 12:28            | 18:38        | <b>11/set</b> | 06:19         | 12:14            | 18:10        |
| <b>16/mar</b> | 06:19         | 12:26            | 18:33        | <b>16/set</b> | 06:14         | 12:13            | 18:11        |
| <b>21/mar</b> | 06:22         | 12:25            | 18:28        | <b>21/set</b> | 06:08         | 12:11            | 18:13        |
| <b>26/mar</b> | 06:24         | 12:23            | 18:22        | <b>26/set</b> | 06:03         | 12:09            | 18:15        |
| <b>1/abr</b>  | 06:27         | 12:22            | 18:16        | <b>1/out</b>  | 05:58         | 12:07            | 18:17        |
| <b>6/abr</b>  | 06:29         | 12:20            | 18:11        | <b>6/out</b>  | 05:52         | 12:06            | 18:20        |
| <b>11/abr</b> | 06:31         | 12:19            | 18:06        | <b>11/out</b> | 05:47         | 12:04            | 18:22        |
| <b>16/abr</b> | 06:33         | 12:17            | 18:01        | <b>16/out</b> | 05:43         | 12:03            | 18:24        |
| <b>21/abr</b> | 06:36         | 12:16            | 17:57        | <b>21/out</b> | 05:38         | 12:02            | 18:27        |
| <b>26/abr</b> | 06:38         | 12:15            | 17:53        | <b>26/out</b> | 05:34         | 12:02            | 18:30        |
| <b>1/mai</b>  | 06:40         | 12:15            | 17:49        | <b>1/nov</b>  | 05:29         | 12:01            | 18:34        |
| <b>6/mai</b>  | 06:43         | 12:14            | 17:45        | <b>6/nov</b>  | 05:26         | 12:01            | 18:37        |
| <b>11/mai</b> | 06:45         | 12:14            | 17:42        | <b>11/nov</b> | 05:24         | 12:02            | 18:40        |
| <b>16/mai</b> | 06:48         | 12:14            | 17:40        | <b>16/nov</b> | 05:21         | 12:02            | 18:44        |
| <b>21/mai</b> | 06:50         | 12:14            | 17:38        | <b>21/nov</b> | 05:20         | 12:04            | 18:47        |
| <b>26/mai</b> | 06:53         | 12:15            | 17:36        | <b>26/nov</b> | 05:19         | 12:05            | 18:51        |
| <b>1/jun</b>  | 06:55         | 12:15            | 17:34        | <b>1/dez</b>  | 05:18         | 12:06            | 18:54        |
| <b>6/jun</b>  | 06:57         | 12:16            | 17:34        | <b>6/dez</b>  | 05:19         | 12:08            | 18:58        |
| <b>11/jun</b> | 06:59         | 12:17            | 17:34        | <b>11/dez</b> | 05:20         | 12:10            | 19:01        |
| <b>16/jun</b> | 07:01         | 12:18            | 17:34        | <b>16/dez</b> | 05:21         | 12:13            | 19:04        |
| <b>21/jun</b> | 07:02         | 12:19            | 17:35        | <b>21/dez</b> | 05:23         | 12:15            | 19:07        |
| <b>26/jun</b> | 07:03         | 12:20            | 17:37        | <b>26/dez</b> | 05:26         | 12:18            | 19:09        |

## ANEXO 2

Valores da concentração espermática de ovinos (mil/mm<sup>3</sup>) obtidos em câmara de Neubauer comparados aos valores obtidos em espectrofotômetro (570 nm) para validação da curva de leitura em espectrofotômetro

| Concentração espermática (mil/mm <sup>3</sup> ) | Leitura em 570nm |
|---|------------------|
| 1795  | 182              |
| 785   | 63               |
| 1280  | 100              |
| 850   | 78               |
| 370   | 34               |
| 1650  | 138              |
| 1675  | 109              |
| 3565  | 325              |
| 2595  | 241              |
| 3275  | 266              |
| 156   | 22               |
| 178   | 23               |
| 885   | 67               |
| 2715  | 213              |
| 2715  | 205              |
| 1740  | 140              |
| 4100  | 300              |
| 1210  | 98               |
| 3395  | 274              |
| 970   | 99               |
| 206   | 27               |
| 320   | 37               |
| 1280  | 126              |



## ANEXO 3

Valores médios mensais e desvio padrão da circunferência escrotal (CE) de carneiros Suffolk cS e rS durante os meses de abril de 2005 a maio de 2006 em latitude 25°25'40''s. Pinhal s (PR).

|      | <i>n</i> | CE (cm)<br>cS       | <i>n</i> | CE (cm)<br>rS       |
|------|----------|---------------------|----------|---------------------|
| ABR  | 12       | 32,35 ± 2,71        | 3        | 34,5 ± 1,41         |
| MAIO | 12       | 31,88 ± 2,59        | 3        | 35,25 ± 1,77        |
| JUN  | 12       | 29,34 ± 2,41        | 3        | 31,75 ± 0,35        |
| JUL  | 12       | <b>27,63 ± 2,27</b> | 3        | <b>30,00 ± 0,0</b>  |
| AGO  | 12       | <b>29,29 ± 2,67</b> | 3        | <b>29,75 ± 1,77</b> |
| SET  | 6        | 32,00 ± 1,49        | 3        | 33,00 ± 0,0         |
| OUT  | 6        | 33,00 ± 0,95        | 3        | 35,75 ± 0,35        |
| NOV  | 6        | 34,35 ± 1,05        | 3        | 35,5 ± 0,71         |
| DEZ  | 6        | 34,96 ± 1,71        | 3        | 35,75 ± 0,35        |
| JAN  | 6        | 37,25 ± 1,60        | 3        | 38,00 ± 1,41        |
| FEV  | 6        | 37,42 ± 1,59        | 3        | 37,75 ± 1,06        |
| MAR  | 6        | <b>37,67 ± 1,89</b> | 3        | <b>41,00 ± 1,41</b> |
| ABR  | ...      | ...                 | 3        | 37,00 ± 1,41        |
| MAIO | ...      | ...                 | 3        | 34,75 ± 1,06        |

NOTA: houve diferença significativa (ANOVA) entre os meses para o cS (  $p < 0,001$ ) e rS ( $p < 0,05$ )



## ANEXO 4

Valores quinzenais de circunferência escrotal (CE) em centímetros de carneiros e reprodutores Suffolk durante os meses de abril de 2005 a maio de 2006 em latitude 25°25'40''s

| mês/<br>carnei-<br>ro | 1    | 701  | 706  | 732  | 747  | 754  | 763  | 775  | 779  | 781  | 806  | 822  | Média         | Média<br>mensal | Média<br>Reprodu-<br>tores |
|-----------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------------|-----------------|----------------------------|
| abr                   | 33   | 32   | 32   | 37   | 36,5 | 36,5 | 35,5 | 30   | 28   | 30   | 32   | 30   | 32,71         | <b>32,35</b>    | <b>34,5</b>                |
| abr                   | 32   | 31   | 32   | 36   | 35   | 35,5 | 33   | 30   | 29   | 28,5 | 31   | 31   | 32,00         | ± 2,71          | ± 1,41                     |
| mai                   | 32   | 31   | 32   | 36   | 35,5 | 37   | 32,5 | 29,5 | 30,5 | 28   | 32   | 32   | 32,33         | <b>31,88</b>    | <b>35,25</b>               |
| mai                   | 32   | 31   | 30   | 33   | 34   | 36,5 | 32   | 27,5 | 30   | 27   | 32   | 32   | 31,42         | ± 2,59          | ± 1,77                     |
| jun                   | 32   | 28   | 28   | 30   | 31   | 34   | 32,5 | 26   | 28,5 | 26   | 30   | 29,5 | 29,63         | <b>29,34</b>    | <b>31,75</b>               |
| jun                   | 31   | 27   | 29   | 28   | 29,5 | 34,5 | 32   | 27   | 27   | 26   | 30   | 28   | 29,08         | ± 2,41          | ± 0,35                     |
| jul                   | 30   | 27   | 26   | 26,5 | 27   | 31,5 | 31   | 27,5 | 26   | 24   | 27   | 27   | <b>27,54*</b> | <b>27,63*</b>   | <b>30,0*</b>               |
| jul                   | 29,5 | 29   | 25,5 | 25   | 28   | 30,5 | 30   | 28,5 | 24   | 23   | 30,5 | 29   | <b>27,71*</b> | ± 2,27          | ± 0,0                      |
| ago                   | 29   | 30   | 26   | 26   | 29,5 | 31   | 30,5 | 30   | 25   | 25   | 32   | 29   | 28,58         | <b>29,29</b>    | <b>29,75*</b>              |
| ago                   |      | 30,5 |      |      | 32   | 33   |      | 32,5 |      |      | 34   | 30   | 32,00         | ± 2,67          | ± 1,77                     |
| set                   |      | 30   |      |      | 31   | 32,5 |      | 32,5 |      |      | 34,5 | 30,5 | 31,83         | <b>32</b>       | <b>33,0</b>                |
| set                   |      | 31   |      |      | 31   | 33,5 |      | 32,5 |      |      | 34   | 31   | 32,17         | ± 1,49          | ± 0,0                      |
|                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |               | <b>33</b>       | <b>35,75</b>               |
| out                   |      | 31,5 |      |      | 33   | 33   |      | 34   |      |      | 34   | 32,5 | 33,00         | ± 0,95          | ± 0,35                     |
| nov                   |      | 31,5 |      |      | 34   | 33   |      | 33,5 |      |      | 33,5 | 34   | 33,25         | <b>34,35</b>    | <b>35,5</b>                |
| nov                   |      | 32   |      |      | 36   | 32   |      | 35,5 |      |      | 36   | 35   | 34,42         | ± 1,05          | ± 0,71                     |
| dez                   |      | 32   |      |      | 35   | 33,5 |      | 35   |      |      | 36,5 | 35,5 | 34,58         | <b>34,96</b>    | <b>35,75</b>               |
| dez                   |      | 32   |      |      | 36,5 | 35   |      | 36   |      |      | 37,5 | 36   | 35,50         | ± 1,71          | ± 0,35                     |
| jan                   |      | 35   |      |      | 39,5 | 37,5 |      | 36,5 |      |      | 39,5 | 37,5 | 37,58         | <b>37,25</b>    | <b>38,0</b>                |
| jan                   |      | 34   |      |      | 38   | 38   |      | 36,5 |      |      | 38   | 37   | 36,92         | ± 1,60          | ± 1,41                     |
| fev                   |      | 33,5 |      |      | 38   | 38   |      | 37   |      |      | 37,5 | 37   | 36,83         | <b>37,42</b>    | <b>37,75</b>               |
| fev                   |      | 34,5 |      |      | 39,5 | 37   |      | 38,5 |      |      | 37   | 38,5 | 37,50         | ± 1,59          | ± 1,06                     |
|                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | <b>38,17*</b> | <b>38,17*</b>   | <b>41,00**</b>             |
| mar                   |      | 35,5 |      |      | 40,5 | 38,5 |      | 39   |      |      | 36,5 | 39   | *             | * ±             | ± 1,41                     |
| mar                   |      | 34,5 |      |      | 40,5 | 37   |      | 37   |      |      | 36   | 38   | 37,17         | 1,83            |                            |
|                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |               |                 | 37,00                      |
| abr                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |               |                 | ± 1,41                     |
|                       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |               |                 | 34,75                      |
| mai                   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |               |                 | ± 1,06                     |

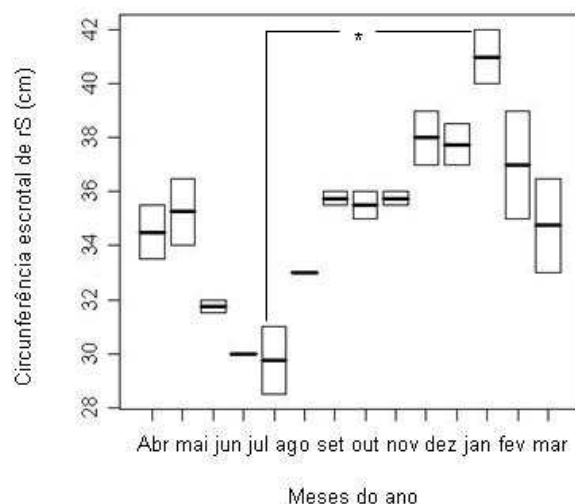
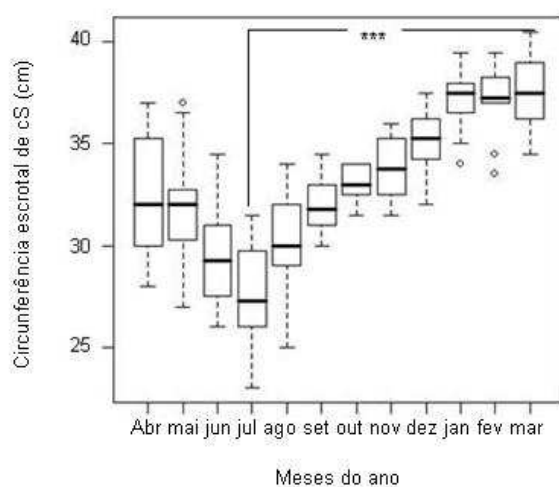
Obs: no mês de agosto seis animais foram abatidos para colheita dos testículos em momento de menor perímetro escrotal

\* menores médias de circunferência escrotal

\*\* maiores médias de circunferência escrotal

## ANEXO 5

Representação em “box plotting” descrevendo os valores das mudanças na circunferência escrotal de carneiros Suffolk cS e rS, de abril de 2005 a março de 2006. Os valores maiores estão acima do retângulo e os menores estão abaixo (representados por pontilhados). O retângulo contém a linha mediana, o 3º quartil (parte superior) e o 1º quartil (parte inferior). Pontos abertos são os valores discrepantes. as diferenças entre os meses foram significativas e aqui indicados os dois pontos extremos que representam as medidas de ce menores (julho) e maiores (março) (\*\* $p < 0.001$  e \*  $p < 0.05$ ) na latitude 25°25'40''s



## ANEXO 6

Massa (Kg) de carneiros (cS) e reprodutores (rS) Suffolk durante os meses de abril de 2005 março de 2006.

| <b>cS</b>   | <b>abr</b>   | <b>mai</b>   | <b>jun</b>   | <b>jul</b>    | <b>ago</b>    | <b>set</b>   | <b>out</b>   | <b>nov</b>   | <b>dez</b>    | <b>jan</b>    | <b>fev</b>    | <b>mar</b>    |
|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>1</b>    | 53,5         | 58,9         | 60,9         | 66,8          | 72,0          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>701</b>  | 52,5         | 53,0         | 55,4         | 59,4          | 63,5          | 65,9         | 66,2         | 68,4         | 71,3          | 75,6          | 76,0          | 76,7          |
| <b>706</b>  | 49,0         | 49,0         | 51,1         | 54,5          | 56,8          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>732</b>  | 55,3         | 56,0         | 58,1         | 57,8          | 60,0          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>747</b>  | 62,3         | 62,9         | 65,7         | 66,9          | 73,4          | 75,0         | 76,3         | 79,4         | 83,4          | 87,3          | 83,8          | 91,5          |
| <b>754</b>  | 56,0         | 58,9         | 61,4         | 62,4          | 67,3          | 68,3         | 69,8         | 72,5         | 75,9          | 77,7          | 76,6          | 75,3          |
| <b>763</b>  | 59,5         | 63,8         | 66,2         | 69,6          | 72,0          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>775</b>  | 38,0         | 45,5         | 48,5         | 52,7          | 59,5          | 61,1         | 62,8         | 66,6         | 69,5          | 72,5          | 74,8          | 71,5          |
| <b>779</b>  | 36,4         | 42,3         | 41,7         | 46,5          | 41,3          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>781</b>  | 45,8         | 50,3         | 51,2         | 53,2          | 58,0          |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>806</b>  | 62,0         | 63,9         | 67,2         | 72,6          | 78,5          | 81,5         | 86,0         | 89,1         | 89,4          | 93,1          | 92,1          | 95,2          |
| <b>822</b>  | 48,0         | 50,5         | 52,5         | 54,1          | 61,2          | 61,5         | 62,3         | 64,9         | 71,3          | 72,4          | 72,5          | 76,2          |
| <b>X</b>    | <b>51,5</b>  | <b>54,6</b>  | <b>56,7</b>  | <b>59,7</b>   | <b>63,6</b>   | <b>68,9</b>  | <b>70,5</b>  | <b>73,5</b>  | <b>76,8</b>   | <b>79,7</b>   | <b>79,3</b>   | <b>81,1</b>   |
| <b>± DP</b> | <b>± 8,5</b> | <b>± 7,3</b> | <b>± 8</b>   | <b>± 8</b>    | <b>± 9,9</b>  | <b>± 8</b>   | <b>± 9,2</b> | <b>± 9,2</b> | <b>± 8</b>    | <b>± 8,51</b> | <b>± 7,3</b>  | <b>± 9,8</b>  |
| <b>rS</b>   |              |              |              |               |               |              |              |              |               |               |               |               |
| <b>X ±</b>  | <b>98,0</b>  | <b>100,0</b> | <b>99,9</b>  | <b>99,15</b>  | <b>104,2</b>  | <b>108,9</b> | <b>112,6</b> | <b>112,6</b> | <b>123,1</b>  | <b>122,3</b>  | <b>122,2</b>  | <b>121,6</b>  |
| <b>DP</b>   | <b>± 0,5</b> | <b>± 1,5</b> | <b>± 0,6</b> | <b>± 0,35</b> | <b>± 0,55</b> | <b>± 0,8</b> | <b>± 2,1</b> | <b>± 2,1</b> | <b>± 0,85</b> | <b>± 0,0</b>  | <b>± 0,25</b> | <b>± 0,65</b> |

OBS: no mês de agosto seis animais foram abatidos para colheita dos testículos  
DP: desvio padrão